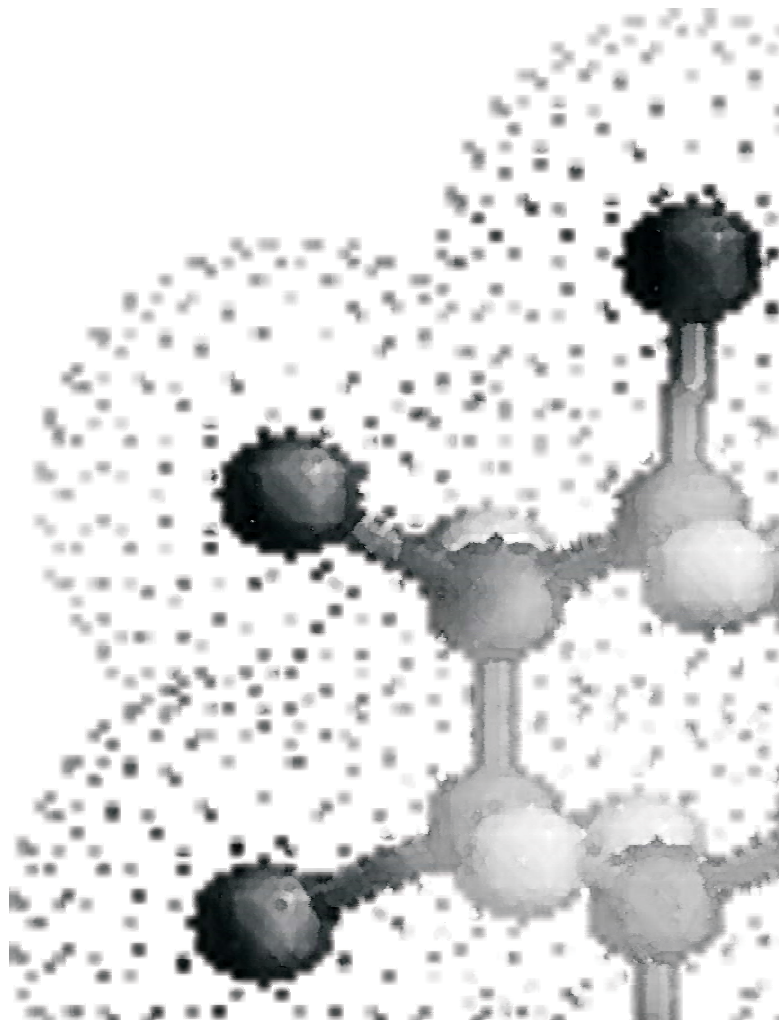


Universidad de Santiago de Compostela  
Departamento de Edafología y Química Agrícola

# Movilidad, biodisponibilidad y degradación inducida de isómeros de Hexaclorociclohexano (HCH) en suelos contaminados

Beatriz Rodríguez Garrido  
Tesis doctoral, 2009





**Departamento de Edafología  
y Química Agrícola**

**MOVILIDAD, BIODISPONIBILIDAD Y DEGRADACIÓN  
INDUCIDA DE ISÓMEROS DE HEXACLOROCICLOHEXANO  
(HCH) EN SUELOS CONTAMINADOS**

**Fdo. Beatriz Rodríguez Garrido  
Santiago de Compostela, 2009**





**Departamento de Edafología y  
Química Agrícola**

D. Felipe Macías Vázquez, Catedrático de Edafología y Química Agrícola de la Facultad de Biología y D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> del Carmen Monterroso Martínez, Profesora Titular del Departamento de Edafología y Química Agrícola de la Facultad de Biología,

**CERTIFICAN:**

Que el presente trabajo titulado “**MOVILIDAD, BIODISPONIBILIDAD Y DEGRADACIÓN INDUCIDA DE ISÓMEROS DE HEXACLOROCICLOHEXANO (HCH) EN SUELOS CONTAMINADOS**”, que para optar al grado de Doctor en Química presenta Beatriz Rodríguez Garrido, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Edafología y Química Agrícola de Universidad de Santiago de Compostela.

Considerando que representa trabajo de Tesis Doctoral, autorizamos su presentación ante la Comisión de Doctorado de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, expedimos el siguiente certificado,

Santiago de Compostela, a 12 de enero de 2009

Fdo.: Dr. D. Felipe Macías Vázquez

Fdo.: Dra. D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> del Carmen Monterroso Martínez





## **Agradecimientos**

*A la Dra. Carmen Monterroso y al Dr. Felipe Macías, directores de esta tesis, por darme esta oportunidad y por enseñarme tanto.*

*Y fuera de formalidades, a Carmela, que además de ser una buena jefa es una buena amiga, gracias por dedicarme tu tiempo y por el esfuerzo de los últimos meses, y a Felipe por transmitirnos su enorme capacidad de trabajo y sus impresionantes conocimientos. Gracias a los dos por permitirme trabajar en lo que más me gusta.*

*A todos los amigos que hice en este Instituto, en el que pasé más horas en los últimos años que en mi casa, a Xesús, a ver si nos toca la quiniela, Maca, Ramón, Edi, Luís, Tapia, Nacho (nuestro salvador informático), Felipe, Lino, Carmina, Manu, Xose, Paula, Chus, Esther, Pablo... a toda la gente del IIT. A Carmen, por enseñarme tanto, sobre todo en el despegue. A Marta C. A todos los compañeros de Edafo.*

*A Dora, Sarah, Rocío, Silvia, Anita, Juan y Florencio, sois los mejores vecinos que del mundo, no se que habría hecho yo sin vosotros, sin los cafés, las comidas, las charlas, las meriendas, las risas, los agobios....*

*A las chicas del CSIC, Ángeles, Petra, Cristina, Lidia, y todas las del café, por acogerme con tanto cariño.*

*A Juan Carlos, por nuestras charlas de Lindano. A mis chicas de Burgos, Stella y Amalla, que ahora sí que vamos a visitaros pronto. A Sonia, Sandra y Giuseppe (y familia). A Olga, que eres un cielo. A Miriam, por el diseño de la portada. A Mari, Maite, Galicia, Maitiña y Anita.*

*A mis amigos, Cathy, Oscar, los del 270477 somos los mejores, Belén, Ángela, Vicente, Sonia, Rafa, Benito, Ritxi (gracias por entenderme e animarme, e que sepades que o próximo viaxe non mo perdo, non vos vades librar de min tan fácilmente), Jorge, Javi, Laura, Carlos, Salo, Rubio, gracias a todos por apoyarme siempre, por los buenos*

*momentos de Santiago, y también los de Celanova, por las partidas de mus y de parchís y por soportarme, ¡que no es poco!*

*A Petra, gracias por ser una amiga de verdad y por estar siempre ahí, a Daniel por hacer de mí la tía Bea y por darme tantas alegrías, a Luís por dejarme tiempo para terminar y a Tomás (ahora ya no podéis cambiar ¿no?), gracias por hacerme sentir siempre como en casa.*

*A mis padres, Josefina y José María, gracias por todo, porque todo es gracias a vosotros, gracias por tanto esfuerzo para ayudarnos siempre, sois los mejores padres que se puede tener. A mi hermana María, gracias por apostar siempre por mí y por pensar que soy mucho mejor de lo que soy. A mi hermana Sara, sobre todo por ser tan alegre y por aguantarme los últimos meses, que no fue fácil... y por ser tan buena compañera de piso. A mi cuñado Jose. A mis abuelos. A mi tía Ana y mis primas y a toda mi familia.... no puedo ponerlos a todos.*

*A Richi, gracias por ser como eres, por hacerme reír, por quererme tanto, por preocuparte por mí, por darme siempre tantos ánimos y confiar tanto en mí y mis posibilidades. Ya ves, te dejé de último, pero no por eso menos importante.*

*Perdón a los que he olvidado en esta lista, son las prisas del último momento. Gracias a todos por aguantarme, sobre todo los últimos meses. Prometo no volver a escribir una tesis..... al menos de momento*

***A mis padres***



## Índice

Justificación y objetivos .....	1
Introducción .....	7
El hexaclorociclohexano .....	9
Producción y uso del hexaclorociclohexano .....	11
Propiedades fisicoquímicas del hexaclorociclohexano .....	12
Toxicidad del hexaclorociclohexano .....	14
Comportamiento del hexaclorociclohexano en el medio .....	16
Procesos de transporte .....	17
Retención .....	20
Transformación .....	21
Biodisponibilidad .....	24
Técnicas de limpieza de los suelos contaminados por contaminantes orgánicos .....	26
Problemática de la contaminación de HCH .....	28
Referencias .....	30
 <b>Capítulo 1:</b>	
<i>Estudio de la contaminación en el polígono de Torneiros (O Porriño)</i> .....	39
Resumen .....	41
Introducción .....	42
Material y métodos .....	45
Estudio de lixiviación .....	45
Estudio de los suelos contaminados de la parcela PV4 .....	48
Estudio de detalle del HCH .....	51
Resultados y discusión .....	54
Lixiviabilidad y ecotoxicidad de HCH .....	54
Estudio de los suelos de la parcela PV4 .....	57
Estudio de detalle del HCH “total” y “biodisponible” .....	64

Conclusiones .....	70
Referencias .....	71

### Capítulo 2:

<i>Retención de los isómeros <math>\alpha</math>, <math>\beta</math>, <math>\gamma</math> y <math>\delta</math>-HCH en suelos y distintos componentes del suelo</i> .....	75
Resumen .....	77
Introducción .....	78
Material y métodos .....	81
Reactivos utilizados .....	81
Sorbentes .....	81
Ensayo de solubilidad .....	84
Experimentos de sorción .....	85
Determinación analítica de HCH .....	86
Análisis de datos .....	87
Resultados y discusión .....	91
Solubilidad del HCH .....	91
Curvas de sorción .....	93
Sorción sobre superficies minerales .....	104
Influencia de la MO en la sorción .....	106
Conclusiones .....	110
Referencias .....	111

### Capítulo 3:

<i>Efecto de exudados radiculares sobre la movilidad de los isómeros de hexaclorociclobexano</i> .....	117
Resumen .....	119
Introducción .....	120
Material y métodos .....	125
Reactivos utilizados .....	125
Experimentos de desorción .....	126

Análisis del suelo .....	127
Resultados y discusión .....	131
Efecto de los exudados sobre la solubilidad de HCH .....	131
Efecto de los AOBPM sobre la solubilidad de HCH .....	136
Conclusiones .....	143
Referencias .....	145

## Capítulo 4:

<i>Deshalogenación reductiva de <math>\alpha</math>, <math>\beta</math>, <math>\gamma</math> y <math>\delta</math>-HCH en medio acuoso</i> .....	151
Resumen .....	153
Introducción .....	154
Material y métodos .....	156
Reactivos utilizados .....	156
Reducción de la vitamina B <sub>12a</sub> .....	157
Ensayo cinético de degradación de HCH .....	158
Preparación de la muestra y métodos analíticos .....	159
Resultados y discusión .....	160
Reacción de reducción de la hidroxocobalamina .....	160
Degradación de HCH en ausencia de hidroxocobalamina .....	161
Degradación de HCH en presencia de hidroxocobalamina .....	163
Productos formados en la degradación de HCH .....	168
Conclusiones .....	174
Referencias .....	175

## Capítulo 5:

<i>Deshalogenación reductiva de <math>\alpha</math>, <math>\beta</math>, <math>\gamma</math> y <math>\delta</math>-HCH en suelos en suspensión</i> .....	181
Resumen .....	183
Introducción .....	184
Material y métodos .....	187
Reactivos utilizados .....	187



La vitamina B <sub>12a</sub> .....	188
Muestras de suelo utilizadas .....	189
Estudio de degradación en “batch” .....	191
Estudio de degradación en reactor .....	191
Preparación de la muestra y métodos analíticos .....	193
Resultados y discusión .....	195
Degradación de HCH en suelo: sistema “batch” .....	195
Degradación de HCH en suelos: reactor .....	200
Productos formados en la degradación de HCH .....	205
Conclusiones .....	208
Referencias .....	210
 Conclusiones generales .....	 215

# Justificación y objetivos



El uso de pesticidas inorgánicos es tan antiguo como la agricultura, pero es en el siglo XX cuando se comienzan a sintetizar los pesticidas orgánicos de manera industrial. La aplicación de estos pesticidas orgánicos supuso un gran avance para la agricultura, sin embargo, lleva asociados importantes problemas de contaminación, debido a su elevada persistencia, toxicidad y bioacumulación. Dentro de estos compuestos orgánicos sintéticos están los pesticidas organoclorados que son considerados contaminantes de interés prioritario por diversos organismos oficiales (Agencia Ambiental Europea, Agencia de Protección del Medioambiente de los Estados Unidos), y algunos de ellos están incluidos entre los compuestos seleccionados en 2001 en la “Convención sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs)” de las Naciones Unidas, en la que se firmó un tratado con el fin de proteger la salud humana y el ambiente de los efectos nocivos de los COPs. Entre estos compuestos estaba el lindano ( $\gamma$ -hexaclorociclohexano o  $\gamma$ -HCH).

El lindano es uno de los pesticidas organoclorados más ampliamente distribuido y corresponde a uno de los ocho isómeros del hexaclorociclohexano (HCH), el único con propiedades insecticidas, aunque durante años se usó el HCH-técnico (mezcla de  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH) como pesticida. El uso indiscriminado de estos compuestos y el vertido incontrolado de los residuos formados durante su fabricación, junto con su elevada persistencia, toxicidad y bioacumulación, han generando importantes episodios de contaminación en todo el mundo.

En Galicia, tras la realización del inventario de suelos contaminados en 1998, se detectó un importante foco de contaminación por residuos de la fabricación de lindano ( $\gamma$ -HCH) en el Polígono de Torneiros, Porriño (Pontevedra). Las estrategias de actuación urgente han requerido el confinamiento de las zonas más contaminadas. Para las zonas de menor contaminación la Xunta de Galicia promovió un proyecto interdisciplinar de investigación para el desarrollo de métodos de limpieza basados en procesos biológicos (“Evaluación y biorremediación de suelos contaminados por isómeros de HCH en el polígono de Torneiros, Porriño (Pontevedra)”, 2000-2001). Estos estudios se ampliaron posteriormente con el proyecto “Biorremediación de suelos y aguas contaminados con lindano y otros isómeros

de hexaclorociclohexano” (2002-2005) y, actualmente, siguen en desarrollo en el proyecto “Estrategias de fitocorrección de suelos en escenarios de contaminación múltiple” (2006-2009), ambos financiados por el Ministerio de Ciencia y Tecnología.

En el marco de estos proyectos de investigación se ha realizado el presente trabajo, en el que se estudió el comportamiento de HCH en el suelo, centrándonos en el estudio de los principales procesos a los que está sometido el HCH cuando es depositado en el suelo, que son transporte, retención y transformación. Todos estos procesos están fuertemente relacionados entre sí y condicionan la biodisponibilidad del contaminante en el suelo, por lo que su estudio es clave para el desarrollo de una metodología de recuperación viable.

El principal objetivo de este trabajo es estudiar los procesos que afectan a la retención y movilidad de HCH en el suelo y desarrollar un método de descontaminación de suelo a través del uso de porfirinas. Para ello se han abordado cinco estudios específicos que se describen en esta memoria en los cinco capítulos que siguen a la introducción.

El primer estudio aborda la caracterización de los sistemas contaminados del área de Porriño. El objetivo fue determinar el tipo, niveles y distribución de la contaminación, comportamiento de los isómeros de HCH en el medio, ecotoxicidad, propiedades de los suelos contaminados y biodisponibilidad de los isómeros de HCH en este área. Para ello se realizaron estudios de lixiviación de HCH a partir de residuo bruto, estudio de suelos contaminados en una parcela experimental y un estudio de detalle para evaluar el contenido “total” y “biodisponible” de HCH. (Capítulo 1)

En el segundo estudio se evaluó la capacidad de retención de los isómeros HCH en distintos tipos de suelos naturales y coloides del suelo, y se relacionó con distintas propiedades edáficas, entre ellas la cantidad y tipo de materia orgánica. Para ello se realizaron ensayos de sorción en “batch” con los isómeros de HCH en niveles de concentración próximos a sus solubilidades en agua en tres tipos de suelo diferentes, en dos muestras de referencia de minerales de arcilla (montmorillonita y caolinita), goetita, ácido húmico comercial y arena (Capítulo 2).

En el tercer estudio se evalúa el efecto inducido por exudados radiculares y diferentes componentes de exudados radiculares sobre la movilidad de los isómeros de HCH en el suelo. Para ello se realizó un ensayo de desorción en “batch” con suelo contaminado con HCH, utilizando exudados radiculares procedentes de *Holcus lanatus*, exudados artificiales, formados por una mezcla de 15 componentes orgánicos (fundamentalmente ácidos orgánicos de bajo peso molecular (AOBPM)) y los 15 compuestos orgánicos por separado. El entendimiento del papel que juegan los exudados radiculares en la solubilización de compuestos orgánicos hidrofóbicos puede tener una implicación importante en el desarrollo de técnicas de biocorrección de este tipo de compuestos (Capítulo 3).

En el cuarto y quinto estudio se desarrolla un método de red degradación reductiva de HCH utilizando hidroxocobalamina (vitamina B<sub>12a</sub>) como catalizador. Para ello se realizó un primer ensayo en medio acuoso para evaluar la capacidad reductiva del ditiotreitól (DTT) o citrato de Ti(III), de forma que la hidroxocobalamina es reducida a dos estados de oxidación diferentes (Capítulo 4). Posteriormente, el método seleccionado (usando citrato de Ti(III) como reductor), fue aplicado a la degradación de isómeros de HCH en dos suelos contaminados artificialmente que presentaban contenidos en materia orgánica marcadamente diferentes. La aplicación desarrollada para suelos fue en forma de suspensión y se probó a dos escalas de laboratorio: batch y en reactor (Capítulo 5).



# Introducción





## El hexaclorociclohexano

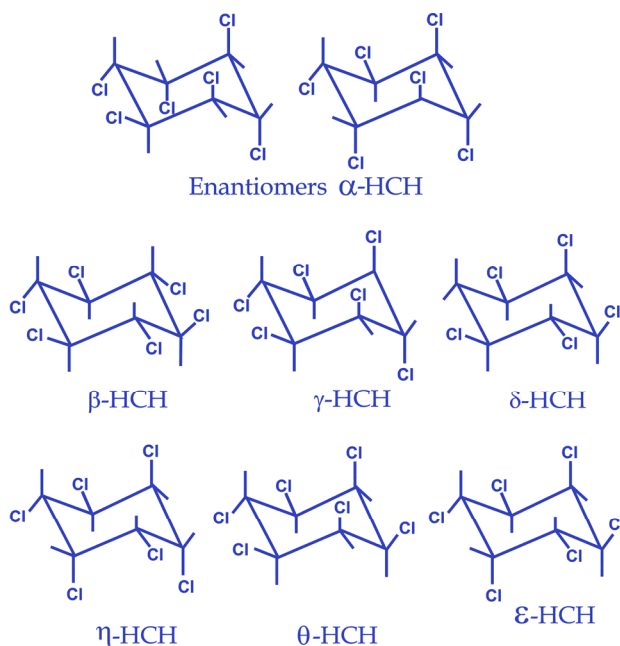
Los pesticidas organoclorados han sido ampliamente utilizados en el pasado con fines médicos y agrícolas; sin embargo, en la actualidad su uso está restringido debido a sus efectos tóxicos y a su persistencia y acumulación en el medio ambiente. Un compuesto muy utilizado, aunque hoy prohibido en muchos países, es el hexaclorociclohexano, un pesticida de amplio espectro. Según su naturaleza fisicoquímica este compuesto se puede clasificar como hidrocarburo organoclorado (pesticida no iónico) y, según su actividad, como insecticida.

Hexaclorociclohexano (HCH) es el nombre que identifica a todos los isómeros del 1, 2, 3, 4, 5, 6- hexaclorociclohexano (Figura 1). Es un compuesto orgánico sintético preparado por primera vez por M. Faraday en 1825 mediante cloración de benceno en presencia de luz (Smith, 1999). Tras esta reacción se forman 8 estereoisómeros del HCH ( $\alpha$ , del que existen dos formas enantioméricas,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  y  $\theta$ ) (Figura 1) que se diferencian entre sí por la posición axial o ecuatorial de los átomos de cloro en torno al anillo de ciclohexano (Willett et al., 1998). En 1935 Bender le atribuyó propiedades insecticidas, tal como se recoge en una patente de la época, y en 1942 Slade demostró que  $\gamma$ -HCH (lindano) era el único isómero realmente insecticida (Matolcsy et al., 1988).

La fabricación del HCH consiste en la fotocloración de benceno. Es una reacción en cadena que comienza con la homólisis de la molécula de  $\text{Cl}_2$  por acción de la radiación UV y continúa con sucesivas adiciones de radicales  $\text{Cl}$  a la molécula de benceno. Tras este proceso se obtiene una mezcla de isómeros, conocida como HCH-técnico (CAS Registry No. 608-73-1) que contiene: 55-80%  $\alpha$ -HCH, 5-14%  $\beta$ -HCH, 8-15%  $\gamma$ -HCH 2-16%  $\delta$ -HCH y una pequeña proporción de otros isómeros (Breivik et al., 1999a). La mezcla de isómeros puede ser purificada para obtener el isómero gamma, para ello el HCH-técnico caliente, se refrigera y parte de los isómeros inactivos (sobre todo  $\alpha$ -HCH) cristalizan. Posteriormente se retiran estos cristales y el exceso de benceno. El producto resultante es HCH fundido con un contenido medio del 40% del isómero gamma (HCH enriquecido). El siguiente paso consiste en realizar una serie de cristalizaciones fraccionadas y una operación de filtrado para obtener un

sólido cuyo contenido es al menos del 99% de  $\gamma$ -HCH (lindano, CAS Registry No. 58-89-9) (WHO, 1991).

En el proceso de producción de lindano aproximadamente un 80% es material residual, compuesto mayoritariamente por los isómeros alfa y beta mezclados con disolventes (Amadori, 1993; Galván López, 1998).



**Figura 1:**

Estructura de los isómeros de HCH. Las posiciones axiales (a) y ecuatoriales (e) de los átomos de Cl son las siguientes:  $\alpha$ , aaeeee;  $\beta$ , eeeee;  $\gamma$ , aaeeee;  $\delta$ , aaeeee;  $\epsilon$ , aeaeae;  $\eta$ , aeaeae; y  $\theta$ , aeaeae (Willett et al., 1998; Buser, and Müller, 1995).

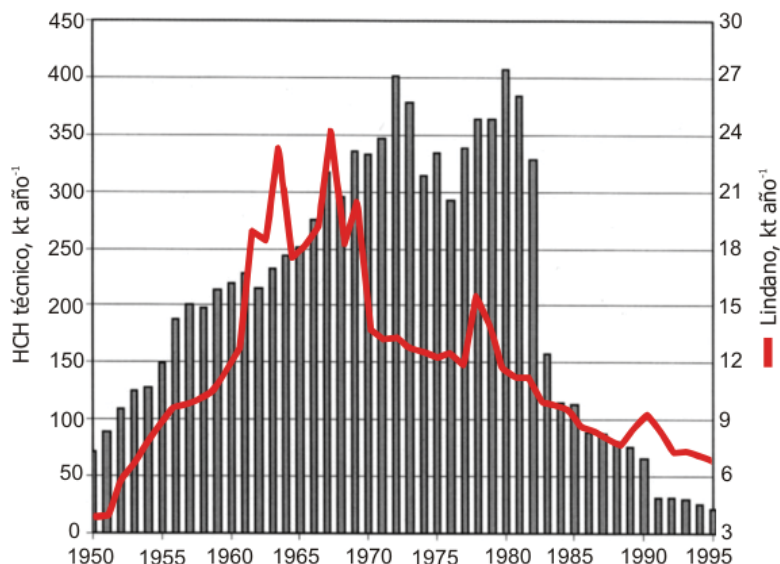
## Producción y uso del hexaclorociclohexano

La producción de HCH comenzó en la década de los 40 y, gracias a sus propiedades insecticidas universales, su rápido efecto y la fácil obtención industrial se introdujo rápidamente en el mercado mundial de productos fitosanitarios y plaguicidas (Li et al., 1998). Las formulaciones comerciales, que incluyen tanto al HCH-técnico como al lindano purificado, han sido comercializados con diferentes nombres, como Agrocide, Ben-Hex, Gammexane, Kwell, Quellad, Lindatox, y Tri-6 (Willett et al., 1998), y de modos muy diferentes, como polvo humedecido, concentrados en emulsión, suspensiones en agua, disoluciones en disolventes orgánicos, en polvo, cebos, aerosoles y formulaciones especialmente preparadas para su uso en humanos o medicina veterinaria (WHO, 1991).

Según datos de producción global (Li, 1999; Breivik et al., 1999) durante el período de 1948 a 1997 se utilizaron a nivel mundial hasta 9,8 millones de toneladas de **HCH-técnico**, con varios picos de intensidad (Figura 2). La curva de producción fue creciente durante el período 1955-1972. A partir de 1973 (año en el comenzaron las prohibiciones de su utilización en Japón (Li, 1999)) hubo un descenso notable, tras el que la producción se recupera y, finalmente, a partir del año 1983 (prohibición en China (Li, 1999)) el descenso es permanente hasta alcanzar niveles muy bajos en 1995. La mayor producción histórica corresponde a China e India, países con gran peso de la agricultura (WHO, 1992). No obstante, regiones industriales como América del Norte, Europa y los territorios de la antigua Unión Soviética también han tenido una gran producción de HCH-técnico (Breivik et al., 1999).

El consumo global de **lindano** con destino agrícola fue de 455 Kilotoneladas (Kt), con picos de hasta 24 Kt anuales, es decir, hasta 10 veces inferior a la producción de HCH-técnico (Li and Vijgen, 2006). Los mayores niveles de producción de este compuesto se produjeron entre 1961-1964, y entre 1966-1972, coincidiendo con la prohibición del HCH-técnico en algunas regiones. Hay un tercer pico de importancia en la producción entre 1979-1982, debido a la prohibición en Estados Unidos del HCH-técnico. A partir de este momento la curva de producción de lindano desciende paulatinamente, coincidiendo con la época de regulación generalizada de este tipo de

compuestos. Estas cifras corresponden al consumo agrícola de lindano pero si se incluyeran también otros usos (ganadería, salud humana, uso doméstico, etc.) la estimación podría aumentar hasta las 600 kt.



**Figura 2:**

Uso mundial de HCH-técnico y lindano entre 1950 y 1995 (modificado por Calvelo Pereira, 2008).

### Propiedades fisicoquímicas del hexaclorociclohexano

El HCH es un sólido blanco, cristalino, de masa molecular 290,8 g mol<sup>-1</sup>, baja solubilidad en agua y un olor muy característico.

Los distintos isómeros presentan propiedades fisicoquímicas muy diferentes entre sí, tal y como se ve en la Tabla 1. En general, son compuestos bastante hidrofóbicos, con valores del logaritmo del coeficiente de distribución octanol/agua (log K<sub>ow</sub>) entre 3,7 y 4,1. Además, son compuestos poco solubles en agua y, aunque en la bibliografía podemos encontrar datos muy variables, todos coinciden en que el isómero beta es el menos soluble de los cuatro. Los datos de solubilidad en agua para α-HCH van desde 2 a 10 mg L<sup>-1</sup>, para β-HCH desde 0,20 a 5 mg L<sup>-1</sup>, para γ-HCH desde 6,2 a 17 mg L<sup>-1</sup> y para δ-HCH desde 9 a 10 mg L<sup>-1</sup>, aunque este es el isómero menos estudiado (Clayton et al., 1981;

Hollifield, 1979; Kurihara et al., 1973; Mackay et al., 1997). La solubilidad de todos los isómeros de HCH es mayor en disolventes orgánicos.

El punto de ebullición es variable, el punto de fusión es alto, destacando los elevados valores en el caso de  $\beta$ -HCH (309-310 °C), mientras que el isómero  $\gamma$ -HCH presenta los valores más bajos (112-113 °C). La presión de vapor de saturación es relativamente alta en el caso del  $\alpha$ -HCH (el isómero más volátil), de un orden similar en  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH, y dos órdenes de magnitud más baja para el isómero  $\beta$ -HCH. Adicionalmente, este isómero tiene un factor de bioconcentración en humanos (FBC) mucho mayor a los otros isómeros de HCH. Estas diferencias se deben fundamentalmente a la diferente disposición espacial de los átomos de cloro en la molécula de ciclohexano. Como se muestra en la Figura 1 todos los átomos de cloro de  $\beta$ -HCH están en posiciones ecuatoriales, lo cual le confiere una mayor estabilidad física y metabólica a este isómero y una mayor compactación molecular. La estabilidad se ve reflejada en la persistencia medioambiental y biológica de este isómero. De hecho el factor de bioconcentración en tejidos humanos es casi 30 veces mayor que la del isómero  $\gamma$ -HCH (Tabla 1), con tres átomos de cloro en posición axial.

Otra de las propiedades de los isómeros de HCH consiste en su capacidad de isomerización. El isómero gamma se puede transformar en alfa por acción de la radiación UV, sin embargo, la velocidad de isomerización es muy baja, del orden de  $10^{-4} \text{ h}^{-1}$  (Buser and Müller, 1995). En general, los isómeros de HCH son estables a la luz, a las altas temperaturas, al agua caliente y a los ácidos, no obstante son desclorados por los álcalis (Willett et al., 1998).

**Tabla 1:**

Principales propiedades fisicoquímicas de los isómeros de HCH más abundantes

(Suntio et al., 1988; Willett et al., 1998)

Propiedad	$\alpha$ -HCH	$\beta$ -HCH	$\gamma$ -HCH	$\delta$ -HCH
Punto de fusión (°C)	159-160	309-310	112-113	138-139
Punto de ebullición (°C)	288 a 760 mm Hg	60 a 0,5 mm Hg	323,4 a 760 mm Hg	60 a 0,36 mm Hg
Presión de vapor (Pa a 20 °C)	$(1,6\pm0,9)*10^{-2}$	$(4,2\pm0,3)*10^{-5}$	$(5,3\pm1,4)*10^{-3}$	$2,1*10^{-3}$
Constante Ley de Henry (Pa m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )	0,870	0,120	0,130	0,073
Log K <sub>ow</sub> <sup>1</sup>	3,9±0,2	3,9±0,1	3,7±0,5	4,1±0,02
FBC <sup>2</sup> en humanos	20±8	527±140	19±9	8,5
FBC en animales acuáticos	2,6±0,5	2,9±0,3	2,5±0,4	ND

<sup>1</sup> Logaritmo del coeficiente de reparto octanol-agua.

<sup>2</sup> Factor de bioconcentración.

## Toxicidad del hexaclorociclohexano

El amplio uso del HCH, su elevada persistencia en el ambiente y su baja biodegradabilidad hacen que estos compuestos sean una amenaza para la salud.

Las principales rutas de exposición a estos compuestos son por contacto, inhalación o ingestión. Aunque no se conocen bien los mecanismos de actuación toxicológica se sabe que el HCH afecta principalmente al sistema nervioso central (SNC), tanto en humanos como en animales (Willett et al., 1998).

La toxicidad aguda detectada en **seres humanos** se manifiesta por fuertes diarreas y convulsiones, que en última instancia pueden conducir a la muerte. La toxicidad crónica detectada en obreros de las fábricas de producción, en agricultores, etc., puede manifestarse a través de problemas relacionados con el sueño y el estrés, así como vómitos frecuentes y sensibilización general. Se han descrito efectos hepáticos, como un incremento en las enzimas o el citocromo

P<sub>450</sub>, aumento de la actividad de los microsomas, aumento del peso del hígado, necrosis de los tejidos, degeneración de las grasas y cáncer de hígado. Respecto al sistema inmunológico, hay un aumento significativo de la inmunoglobulina M. Respecto al sistema reproductor se ha detectado un aumento en niveles hormonales (hormona luteinizante) en trabajadores; asimismo, se encontraron altos niveles de  $\gamma$ -HCH y HCH total en mujeres con abortos o partos prematuros.

Aunque no hay estudios concluyentes acerca de los efectos cancerígenos en humanos, la agencia norteamericana para la protección del medio ambiente (EPA) clasifica tanto al isómero  $\alpha$ -HCH como al HCH-técnico como carcinógenos de tipo B2 (probable carcinógeno humano), el  $\gamma$ -HCH como B2/C, el  $\beta$ -HCH como tipo C (posible carcinógeno humano) y el isómero  $\delta$ -HCH como carcinógeno D (no clasificado) (Willett et al., 1998).

En **insectos**, sus efectos se manifiestan con temblores, ataxia, espasmos y parálisis que, finalmente, detiene la respiración. En animales se han encontrado graves efectos hepáticos. Respecto al sistema inmunológico, existe inmunodepresión y reducción de los folículos linfoides, con un descenso de la población de linfocitos y del tamaño de los cordones medulares, así como necrosis en zonas de la médula. Respecto al sistema reproductor se sabe que  $\beta$ -HCH atrofia el sistema reproductor de las ratas y algunos estudios han detectado descenso en el recuento de esperma, atrofia de ovarios, aumento del ciclo estrogénico y descenso de la tasa de ovulación (Willett et al., 1998).

Desde el punto de vista microbiológico, se ha encontrado que el HCH inhibe las reacciones de oxidorreducción en microorganismos del suelo, así como a bacterias amonio- y metano-oxidantes (Singh and Kuhad, 1999).

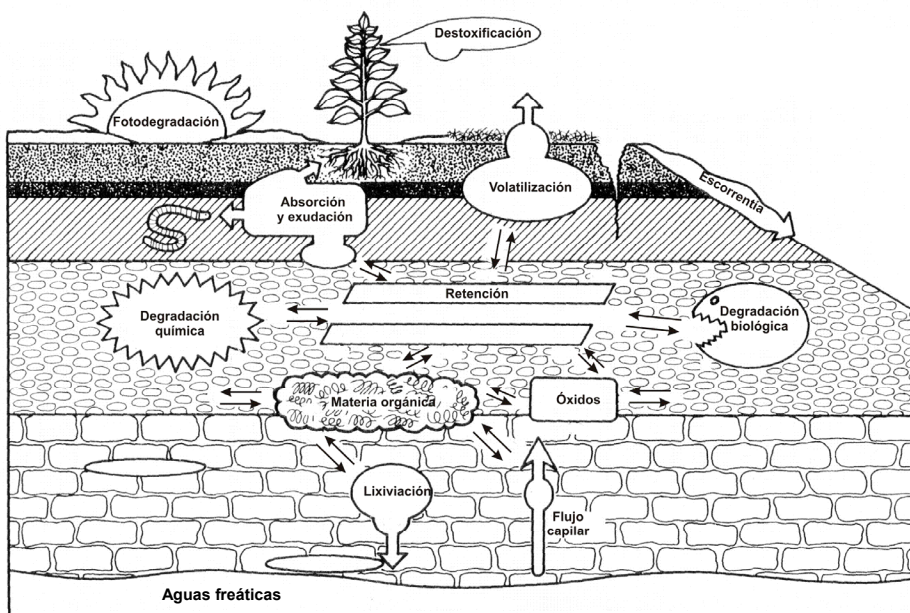
Además, el HCH y sus isómeros son compuestos con, al menos, una moderada toxicidad para las plantas, describiéndose efectos negativos en la germinación, crecimiento y desarrollo inicial de diferentes especies (Kostoff, 1948; Calvelo Pereira, 2008).



# Comportamiento del hexaclorociclohexano en el medio

Las principales causas de contaminación por HCH en el medio ambiente son consecuencia tanto de la aplicación de HCH-técnico y lindano como productos agrícolas como de los vertidos incontrolados de los residuos de su producción industrial.

Tras el vertido los pesticidas, en general, pueden sufrir en el medio diferentes procesos físicos, químicos o biológicos muy relacionados entre sí (Figura 3). Una parte puede pasar a la atmósfera por volatilización o como materia particulada y recorrer largas distancias o bien descomponerse bajo la acción de la luz solar; otra parte puede alcanzar las aguas superficiales (ríos, lagos) debido a escorrentía, drenaje, erosión; sin embargo, una fracción importante del pesticida permanece en el suelo, donde puede verse sometida a diversos procesos de transporte, retención y/o transformación (Weber and Miller, 1989). Los procesos de transporte implican un movimiento del pesticida, los procesos de retención implican interacciones del pesticida con la fase sólida del suelo y los procesos de transformación implican cambios en su estructura (Cornejo and Moreno, 1998; Weber and Miller, 1989). Un elevado número de factores influye en la evolución de estos compuestos, como la topografía del lugar, humedad, radiación solar, climatología y características biosféricas, en general, y principalmente por las características estructurales y fisicoquímicas del propio suelo y la estructura y características del compuesto (Tejedor Gilmartin et al., 1974).



**Figura 3:**  
Procesos que sufren los  
pesticidas en el medio  
ambiente (Weber and  
Miller, 1989).

### Procesos de transporte

El transporte de un pesticida presente en el suelo puede ocurrir de diferentes maneras, las más comunes son: volatilización, lixiviación, escorrentía, difusión y absorción radicular.

La **volatilización** es el proceso fisicoquímico por el cual un compuesto es transferido a la fase gaseosa. Puede resultar de la evaporación de la fase líquida, sublimación de la fase sólida, evaporación de una disolución acuosa o desorción de la matriz del suelo (Bedos et al., 2002). Las pérdidas por volatilización son muy variables, desde insignificantes a más del 50%, dependiendo de las propiedades fisicoquímicas del pesticida, las características del suelo, las condiciones climáticas y las prácticas de cultivo (Bedos et al., 2002).

Las características fisicoquímicas del compuesto juegan un papel fundamental en la determinación del comportamiento del pesticida después de su aplicación. La presión de vapor, solubilidad en agua (y, consecuentemente, el coeficiente de Henry o coeficiente de reparto entre la fase gaseosa y la fase acuosa) y el coeficiente de adsorción son los más relevantes (Bedos et al., 2002).

Además, el aumento de temperatura y humedad del suelo favorecen el proceso de volatilización (Bedos et al., 2002).

El paso de un compuesto a la atmósfera hace posible su transporte a grandes distancias y su posible retorno a sistemas terrestres o acuáticos por deposición. Existen evidencias de volatilización de los isómeros de HCH. En los años 1980-1990 se detectaron rastros de HCH en lugares tan alejados como el Ártico, en parajes naturales de alta montaña o en los océanos (Li and Macdonald, 2005).

Una vez que el HCH se ha volatilizado, tiene tendencia a permanecer en estado gaseoso en latitudes intermedias; no obstante, también puede adsorberse sobre materia particulada en suspensión, permanecer como cristales, o bien en disolución en las gotas de agua (Bidleman, 1988). En la atmósfera, el HCH puede ser dispersado y transportado por el viento. En estas condiciones, es posible un transporte a larga distancia, siguiendo las corrientes atmosféricas dominantes, lo que ha sido modelizado teniendo en cuenta el proceso conocido como Efecto de Destilación Global, que implica un movimiento de los contaminantes desde regiones cálido-templadas hacia latitudes altas, donde el descenso de la temperatura provoca su depósito (Walker et al., 1999).

Las concentraciones de HCH encontradas en las masas de aire se relacionan con las concentraciones en los océanos, actuando éstos como sumideros de HCH. Este proceso es reversible, ya que se podría invertir el flujo de HCH hacia la atmósfera (Willett et al., 1998). El  $\alpha$ -HCH se transporta hacia el norte con las masas de aire, y se acumula en las aguas frías superficiales del océano Ártico. En el caso del isómero beta, menos proclive a pasar a la fase gaseosa, se transporta del mismo modo en las masas de aire, pero existe una pérdida selectiva en su movimiento hacia las latitudes septentrionales, ya que este isómero tiende a ser “descargado” en las masas de agua en las etapas iniciales del transporte a larga distancia (Li et al., 2002).

La **lixiviación** es el proceso por el cual el agua, procedente de lluvia o de riego, arrastra o disuelve moléculas de plaguicidas, dando lugar a un movimiento vertical a lo largo del perfil del suelo. El riesgo de contaminación de acuíferos depende fundamentalmente de la velocidad de transporte a través del suelo y de su retención y degradación a lo largo del perfil (Bowman, 1989).

Se ha demostrado que la materia orgánica disuelta en las aguas superficiales puede facilitar la solubilidad del HCH (Chiou, 1989), esto facilita el transporte de los contaminantes en la disolución del suelo, favoreciendo en última instancia la contaminación de acuíferos y agua freática.

La **escorrentía** tiene lugar cuando la precipitación o riego superan la velocidad de infiltración del agua. El pesticida se arrastra en disolución y también en las partículas del suelo erosionadas de la superficie (Weber and Miller, 1989). Según Wauchope (1978), las pérdidas de pesticidas por escorrentía tienen lugar en disolución cuando su solubilidad es mayor de  $2 \text{ mg l}^{-1}$  y en forma de partículas, unidos a los coloides del suelo, cuando su solubilidad es menor de  $2 \text{ mg l}^{-1}$ . Los factores más importantes que determinan la pérdida por escorrentía son: la pendiente del terreno, la humedad del suelo, la cantidad y frecuencia de las precipitaciones y la capacidad de retención del agua del suelo.

Las pérdidas por escorrentía son normalmente menores del 5 % de la cantidad de pesticida aplicada, incluso en las peores condiciones. Generalmente la cantidad total es proporcional a la cantidad aplicada (Wauchope, 1978).

La **difusión** ocurre cuando un pesticida es transportado de una zona en la que está a altas concentraciones a otra de menor concentración. La difusión es un proceso mucho más lento que la lixiviación, que depende, además del gradiente de concentración, de las características del suelo y de la estructura molecular del pesticida (Burner et al., 1997).

La **absorción radicular** es el proceso mediante el que los compuestos se transportan al interior de las plantas. La polaridad del pesticida es el factor clave en este proceso, aunque, el volumen de suelo circundante a la raíz tiene también un papel importante. Para los compuestos no polares la cantidad de materia orgánica del suelo es particularmente significativa. Hay otros factores a tener en cuenta, como el pH, la cantidad de arcilla y la actividad microbiana, puesto que influyen en la solubilidad del pesticida (Burner et al., 1997). La exudación radicular es también muy importante en los procesos de movilidad de contaminantes en el suelo, ya que se ha demostrado que puede aumentar su solubilidad (Miya and Firestone, 2001; White et al., 2003).

La vegetación constituye un importante sumidero de pesticidas, ya que es capaz de retenerlos en diferentes órganos (Muir et al., 1993; Simonich and

Hites, 1995). Asimismo, la vegetación facilita la acumulación de los compuestos organoclorados en los suelos una vez que los residuos vegetales se incorporan a éstos (Horstmann and McLachlan, 1996). En el caso del HCH, se han detectado residuos de este pesticida tanto en raíces como en los tejidos aéreos de diversas especies vegetales (Simonich and Hites, 1995; USC, 2003).

### Retención

El proceso de retención (o sorción) se refiere a la capacidad del suelo de recluir a un pesticida u otro compuesto e impedir su movimiento fuera de la matriz del suelo. Este término incluye diferentes procesos: **adsorción** (acumulación de un compuesto sobre una superficie), **precipitación** (acumulación de una sustancia para formar una nueva fase sólida), **absorción** en partículas u organismos (migración al seno de una fase sólida), **oclusión** (incorporación del compuesto a un hueco o a una estructura, que al evolucionar no permite su salida) y formación de enlaces covalentes o “**bound residues**” (Koskinen and Harper, 1990).

Las interacciones que tienen lugar en los procesos de retención son: enlace iónico, enlace covalente, puentes de hidrógeno, transferencia de carga, cambio de ligando, fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas. Scheunert (1992) demostró que las interacciones responsables de la sorción inicial se modifican durante la permanencia de los contaminantes orgánicos en el suelo, y a lo largo del tiempo se observa un descenso de las cantidades desorbibles, este efecto se conoce como envejecimiento o “efecto aging”.

La capacidad de retención de un suelo depende principalmente del contenido y naturaleza de la materia orgánica, arcilla y óxidos, del pH, humedad, capacidad de intercambio catiónico y área superficial específica. Para los compuestos hidrofóbicos la retención en el suelo es debida fundamentalmente a la materia orgánica (Chiou, 1989; Schulten et al., 2001; Senesi, 1992), aunque los mecanismos involucrados en el proceso no están claramente demostrados (Benoit et al., 1996). En suelos pobres en materia orgánica, son los contenidos en arcilla y óxidos de hierro los que influyen en la retención y/o transporte de HCH (Wahid and Sethunathan, 1979). En algunos casos se ha encontrado una mayor correlación entre la sorción y el contenido de

arcilla de los suelos que con el de materia orgánica (Cox et al., 1993; Hermosin and Cornejo, 1991; Hermosin et al., 1991; Wauchope et al., 2002), pero en todos estos casos el compuesto orgánico considerado tenía características polares, iónicas o ionizables.

Generalmente, para los compuestos orgánicos (polares y no polares) se observa una correlación entre el coeficiente de distribución suelo/agua ( $K_d$ ) y el contenido de materia orgánica de suelos y/o sedimentos; y se utiliza normalmente el coeficiente de distribución agua/carbono orgánico ( $K_{CO}$ ). El valor de  $K_{CO}$  para una misma molécula orgánica puede variar de un suelo a otro. Esto sugiere que la sorción puede no ser el resultado de una única interacción con la materia orgánica, por lo que se debe tener en cuenta, además, la influencia de los constituyentes minerales y las condiciones físico-químicas. La distribución heterogénea de la materia orgánica en el suelo también puede ser la causa de variaciones del  $K_{CO}$  entre los suelos. Además, no sólo la cantidad y distribución de la materia orgánica, sino también la **naturaleza de los constituyentes orgánicos** varía. El coeficiente de sorción  $K_{CO}$  no tiene en cuenta las propiedades de la materia orgánica, como el carácter polar o no polar, su estructura y configuración molecular, pero se sabe que estos factores afectan a la retención de moléculas orgánicas (Benoit et al., 1996).

## **Transformación**

Los pesticidas se ven afectados en el suelo por diferentes transformaciones que son las responsables de su desaparición (Weber and Miller, 1989). Los procesos de transformación pueden ser divididos en dos grupos: **degradación química** (o degradación abiótica) y **degradación microbiana** (o biodegradación), aunque es muy difícil distinguir las transformaciones microbianas de las químicas. La **fotodegradación** es un tipo de transformación abiótica que consiste en la degradación del pesticida por efecto de la luz solar. Esta reacción es importante para muchos pesticidas, sobre todo para aquellos que son aplicados en superficie.

En los suelos, las **transformaciones abióticas** se producen en la fase líquida y en la interfase sólido-líquido. Las reacciones de hidrólisis y redox son las transformaciones abióticas más importantes, aunque también pueden

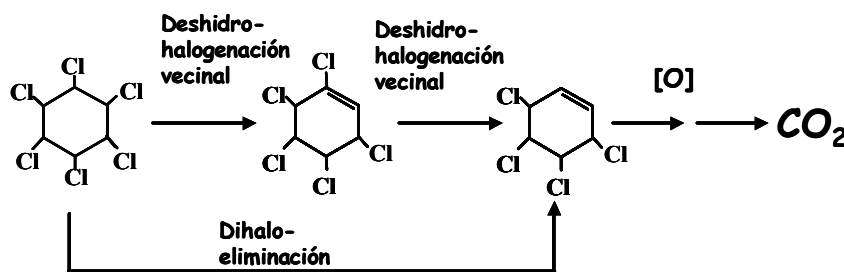
presentarse otras reacciones. Hay varias propiedades físicas que afectan a la reactividad química en el agua, entre ellas el pH, la catálisis ácida o básica, la temperatura, la materia orgánica disuelta y los sólidos en suspensión.

La **biodegradación** en suelos incluye procesos químicos derivados, principalmente, de la actividad microbiana, que en un sistema suelo-planta aumenta en la zona de las raíces (rizosfera). La degradación microbiana de un contaminante orgánico puede tener lugar por diversos procesos: (i) por el uso del contaminante como fuente de C y de electrones (energía) (por ejemplo hidrocarburos); (ii) por el uso de contaminantes como fuente de nutrientes (por ejemplo N en el caso de explosivos como el TNT); (iii) por el uso del contaminante como aceptor de electrones (por ejemplo deshalogenación reductiva); y (iv) mediante reacciones co-metabólicas (por ejemplo liberación de enzimas para degradar un determinado sustrato no contaminante que al mismo tiempo actúa sobre el contaminante, caso de los enzimas ligninolíticos). En muchos casos los microorganismos son capaces de mineralizar completamente al pesticida. Los principales factores que influyen en la actividad microbiana son: pH, cantidad de materia orgánica, nutrientes, humedad, temperatura, aireación y capacidad de intercambio catiónico (Burner et al., 1997).

En el caso del HCH los procesos degradativos en suelos (tanto bióticos como abióticos) pueden ser de oxidación o reducción. La facilidad de degradación de los diferentes isómeros depende de su isomería. La deshalogenación aumenta con el número de cloros en posición axial en la molécula, de tal modo que, teóricamente, el orden creciente de reactividad sería:  $\beta$ -HCH (ningún Cl en posición axial) <  $\delta$ HCH (1 Cl en posición axial) <  $\alpha$ -HCH (2 Cl en posición axial) <  $\gamma$ -HCH (3 Cl en posición axial) (Buser and Müller, 1995), aunque en algunos casos de deshalogenación aeróbica este orden se ve ligeramente alterado (Johri et al., 1998; Sahu et al., 1995).

La deshalogenación oxidativa tiene como ventaja la mineralización de HCH a CO<sub>2</sub> al final de la reacción, pero como inconveniente que esta mineralización generalmente no es completa, y se forman intermedios persistentes, como los fenoles (Datta et al., 2000; Mougin et al., 1996). En la mayoría de los estudios la ruta de degradación oxidativa descrita (Figura 4) comienza con la formación de pentaclorociclohexeno (PeCCH) por

deshidrohalogenación y después se forma tetraclorociclohexeno (TeCCH) (que se puede formar por deshalogenación de PeCCH o por dihaloeliminación de HCH). A partir de TeCCH se forman fenoles clorados, ciclohexenoles clorados o bencenos clorados y termina con una mineralización completa de HCH a  $\text{CO}_2$  (Bachmann et al., 1988; Datta et al., 2000; Johri et al., 1998; Mougin et al., 1996; Sahu et al., 1995).



**Figura 4:**

Ruta de degradación oxidativa de HCH más aceptada

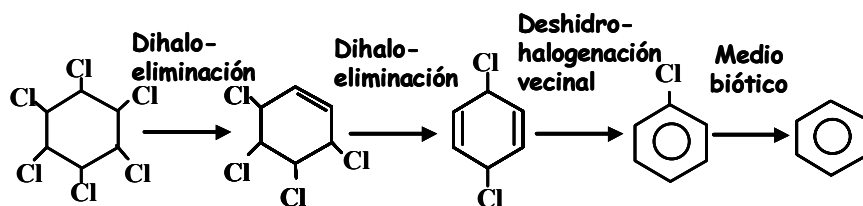
La deshalogenación reductiva en medios anaeróbicos da lugar a compuestos que son generalmente menos bioacumulables y más susceptibles a la degradación oxidativa (Kuhn and Suflita, 1989; Sims et al., 1991). Algunos microorganismos participan en la descloración reductiva de los isómeros de HCH (Buser and Müller, 1995; Jagnow et al., 1977; Middeldorp et al., 1996; van Eekert et al., 1998b). El punto intracelular donde se produce la transferencia electrónica es generalmente un metal de transición coordinado a un tetrapirrol, por ejemplo el Co de la vitamina  $\text{B}_{12}$  y el Ni de la coenzima  $\text{F}_{430}$ , presentes en organismos metanogénicos (Mazumder et al., 1987; van Eekert et al., 1998a).

En condiciones extracelulares, estos tetrapirroles siguen siendo activos como catalizadores y actúan como transportadores de electrones en el proceso de descloración reductiva bajo condiciones abióticas en presencia de una fuente de electrones externa (Assaf-Anid et al., 1994; Chiu and Reinhard, 1995; Lewis et al., 1996; Marks et al., 1989, Rodríguez-Garrido et al., 2004). Marks et al.



(1989) demostraron la descloración reductiva de  $\gamma$ -HCH con tetrapirroles que contienen Co en sistemas abióticos, usando DTT como agente reductor.

La ruta principal de deshalogenación reductiva (Figura 5) de todos los isómeros de HCH comienza con una dihaloeliminación (o didescloración vecinal) formándose TeCCH, a continuación otra dihaloeliminación produce la formación de diclorociclohexadieno (DCCH) que reacciona mediante una deshidrohalogenación vecinal anti-paralela, produciéndose monoclorobenceno (MCB) (reacción abiótica espontánea). En medio biótico, la reacción continúa para producir benceno. La proporción MCB:benceno es muy variable según el medio de reacción (Middeldorp et al., 1996; van Eekert et al., 1998b). La formación de PeCCH, benenos clorados y fenoles en medios reductores ocurre probablemente por eliminación de HCl o aromatización a través de deshidrogenación química o bioquímica (Jagnow et al., 1977).



**Figura 5:**

Ruta de degradación reductiva de HCH más aceptada

## Biodisponibilidad

El término “biodisponible” se refiere a la fracción de un compuesto que es accesible para los organismos vivos y determina su posible toxicidad. La incorporación de un compuesto orgánico a la materia orgánica y/o la migración lenta a microporos inaccesibles para los microorganismos del suelo son los

principales responsables de la disminución de su biodisponibilidad (Alexander, 2000).

En el medio natural todos los procesos involucrados en la movilidad y degradación de los isómeros de HCH están estrechamente relacionados con la biodisponibilidad, de tal forma que los procesos que favorecen la movilidad aumentan también su biodisponibilidad y los procesos degradativos disminuyen la cantidad de contaminante disponible para su asimilación por organismos vivos (Pignatello and Xing, 1996).

Los procesos de retención-desorción tienen gran importancia puesto que, al determinar la cantidad de pesticida presente en la disolución del suelo controlarán otros procesos que afectan a la dinámica de pesticidas en el suelo. La sorción inicial rápida es generalmente por enlace de H y fuerzas de van der Waals, mecanismos que se espera que ocurran instantáneamente al entrar en contacto los HOC con la superficie del suelo. Los enlaces covalentes son más fácilmente asociados con los contaminantes que son parecidos a la MO, enlaces estables y de incorporación irreversible al suelo (Semple et al., 2003).

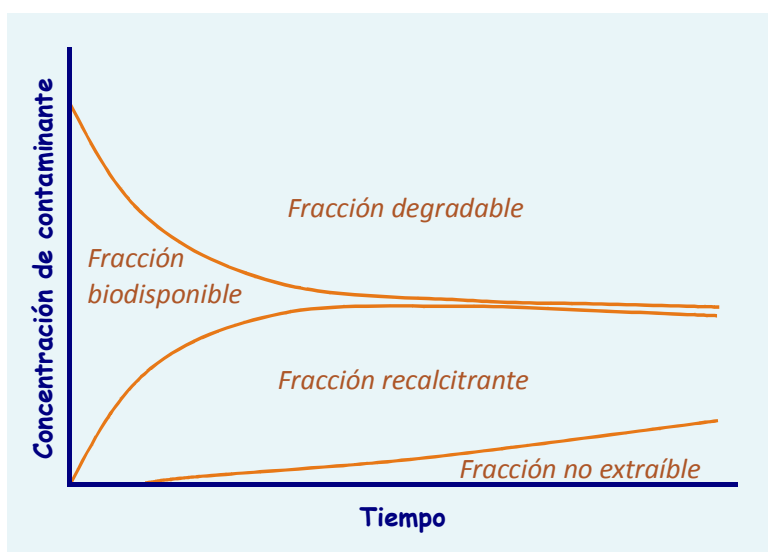
Según aumenta el tiempo de contacto ente los contaminantes orgánicos y el suelo la biodisponibilidad disminuye; a este fenómeno se le conoce como envejecimiento o efecto “aging” (Alexander, 2000). Cuando un contaminante orgánico llega al suelo puede observarse una desaparición inicial rápida que puede ser debida a volatilización o degradación. Con el paso del tiempo esta desaparición se va haciendo más lenta y después de un tiempo imperceptible, indicando que estos compuestos se han hecho poco disponibles (Alexander, 2000).

Hay dos hipótesis para explicar el envejecimiento de los contaminantes en el suelo (Semple et al., 2003): (1) la difusión lenta de los COH dentro de la fracción de MO sólida del suelo, este concepto sugiere el “secuestro” (retención) de los COHs en la M.O. del suelo y (2) la difusión lenta, absorción y captura de los contaminantes orgánicos en nano y microporos del suelo. Probablemente, el envejecimiento es resultado de la combinación de ambos procesos, en los cuales los contaminantes migran hacia sitios inaccesibles en la matriz del suelo.

En la Figura 6 se presenta un esquema de la evolución del contaminante en el suelo. Con el paso del tiempo disminuyen las fracciones biodisponible y

degradable, y aumentan las fracciones recalcitrante y no extraíble (Semple et al., 2003). No obstante, existen muchos comportamientos diferentes a éste en la evolución de los compuestos orgánicos por acciones metabólicas.

Si bien el proceso natural de retención de contaminantes orgánicos en el suelo disminuye la biodisponibilidad de los mismos y, por tanto, la eficiencia de las acciones de limpieza que se puedan llevar a cabo, este proceso puede contemplarse como una vía mediante la cual se reduce el riesgo de toxicidad y lixiviabilidad de los mismos.



**Figura 6**  
Variación de la extractabilidad y biodisponibilidad del contaminante con el tiempo.

## Técnicas de limpieza de los suelos contaminados por contaminantes orgánicos

Los procesos utilizados en la eliminación de la contaminación en los suelos pueden ser de carácter físico, químico o biológico, o una combinación de todos ellos. La aplicación de estos tratamientos puede ser de maneras diferentes: *in situ*, si el contaminante es eliminado en el mismo lugar en el que se encuentra;

*on site*, si el suelo es excavado y tratado en el mismo terreno; *off site* o *ex situ*, cuando el suelo es excavado, transportado y tratado en otro lugar. Estas distinciones han generado una gran cantidad de técnicas aplicables a distintas situaciones.

Se puede hablar de técnicas de aislamiento y técnicas de descontaminación. Las **técnicas de aislamiento** no están enfocadas a la recuperación o eliminación del contaminante sino a evitar la movilización de este, creando una barrera física que aisle el contaminante. Entre estas técnicas se incluye la construcción de celdas de aislamiento, la estabilización del suelo (solidificación, vitrificación del contaminante) o el bombeo de aguas contaminadas. Las **técnicas de descontaminación** pretenden eliminar o reducir la concentración de los contaminantes, de modo que sea posible una reutilización del suelo. Las técnicas de descontaminación se basan en (Monterroso Martínez, 2006):

- Procesos físicos, como el tratamiento térmico, la extracción con disolventes y adsorción sobre carbono activo (de mayor aplicación en aguas).
- Procesos químicos, como la degradación oxidativa o reductiva de compuestos organoclorados.
- Procesos biológicos, que podemos dividirlos en procesos microbianos, que inducen la biodegradación en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Reinhard et al., 1999) y procesos inducidos por la vegetación o fitorecuperación, como la absorción, metabolización, degradación en la rizosfera, etc. (Newman and Reynolds, 2004).

Las técnicas de descontaminación biológicas son especialmente adecuadas para limpiar grandes superficies con un nivel de contaminación lo suficientemente bajo como para no limitar el desarrollo biológico. La fitoremediación es una técnica de descontaminación *in situ* que ofrece la ventaja de eliminar o reducir la contaminación a bajo coste (Newman and Reynolds, 2004).

No existe una técnica universal de aplicación efectiva para cualquier caso. En cada situación concreta es necesaria la realización de rigurosos estudios de

viabilidad, tanto ensayos en laboratorio (en condiciones óptimas de control) como experiencias en campo (sujetas a gran variabilidad). Los resultados van a depender en gran medida de la naturaleza del tratamiento, del tipo de compuesto presente y de las características fisicoquímicas, mineralógicas y biológicas de los suelos afectados. Se debe tener en cuenta multitud de factores adicionales de gran relevancia, como el volumen de suelo a tratar, la profundidad de la contaminación, las condiciones ambientales, los objetivos marcados para la recuperación, el coste y la viabilidad (Rulkens, 1993).

## Problemática de la contaminación de HCH

Durante muchos años no se tuvo conciencia de los peligros que conllevaba la fabricación y uso del HCH y, en muchos lugares, los residuos de fabricación fueron vertidos al medio ambiente sin ningún tipo de control. A lo largo de los últimos años se han detectado numerosos focos de contaminación por HCH; algunos de los más importantes se encuentran en China, Estados Unidos, Holanda y España.

En España, los focos más importantes se localizan en el País Vasco, Sabiñánigo (Aragón) y Galicia, en el polígono de Torneiros, (O Porriño, Pontevedra) donde los residuos de la fabricación de lindano (compuestos mayoritariamente por  $\alpha$ - y  $\beta$ -HCH y en menor proporción por  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH) fueron vertidos sin control durante años. En el polígono de Torneiros el inicio de estos vertidos tuvo lugar entorno a los años 1948-1954 y es probable que se prolongaran hasta 1964. Posteriormente tuvo lugar un esparcimiento por todo el terreno de los residuos depositados como consecuencia de traslado de tierras y allanamiento (Eptisa, 1999), por lo que es imposible conocer con precisión su composición, cantidad, distribución espacial o el grado de transformación que han experimentado por acción de la intemperie y la actividad biológica de los suelos.

Se trata de una zona de extensión considerable (4.3 Ha, aproximadamente), cuyos terrenos podrían ser declarados como suelos contaminados según el Real Decreto 9/2005, que establece como niveles

genéricos de referencia (NGR) en suelos para uso industrial  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  para  $\alpha$ -HCH,  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  para  $\beta$ -HCH y  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  para  $\gamma$ -HCH, siendo muy inferiores para otros usos. Los contenidos de HCH total son además muy superiores a los  $2 \text{ mg kg}^{-1}$  ( $\alpha + \beta + \gamma$ ) que la normativa de la Xunta de Galicia admite como valor de intervención (Decreto 263/1999 del 30 de septiembre, *polo que se fixa a concentración límite en solos afectados por vertidos de residuos de HCH*) y a los  $2 \text{ mg kg}^{-1}$  de HCH total que la normativa europea establece como límite máximo de contaminación de HCH para vertidos de residuos industriales (Directiva 491/84/CE, relativa a los valores límite y objetivos de calidad para los vertidos de hexaclorociclohexano (HCH)).

La contaminación alcanzaba en muchos puntos profundidades de más de 6 metros, lo que implica un volumen de tierras contaminadas superior a los  $130.000 \text{ m}^3$ . En la zona se detectaron indicios de trabajos de allanamiento y eliminación de montículos de rellenos de origen antrópico, así como lugares dispersos de vertidos de residuos sólidos urbanos. El acuífero presentaba contaminación, existiendo un flujo claro hacia el cauce del cercano río Louro (Eptisa, 1999).

Ante la falta de tecnologías viables de descontaminación disponibles la alternativa que se escogió para el control del foco principal de la contaminación en el Polígono de Torneiros consistió en el confinamiento en una celda de seguridad *in situ* de los suelos. La zona de gran contaminación se clausuró y encapsuló mediante obra de ingeniería en el año 2001, según un proyecto específico promovido por la Xunta de Galicia, consistente en la construcción de una pantalla perimetral (900 m de perímetro), impermeabilizando la parte superficial del área contaminada (USC, 2003).

Además del foco principal, Eptisa localizó una serie de focos secundarios de contaminación; se trataba de zonas en el entorno del polígono que presentaban indicios de elevadas concentraciones de HCH. Uno de estos focos secundarios fue destinado a la investigación y desarrollo de técnicas viables de descontaminación de suelos basadas en procesos biológicos. Se desarrollaron diversos estudios por el CSIC, la Universidad de La Coruña y la Universidad de Santiago de Compostela, y en este contexto se desarrolló el presente trabajo.

## Referencias

- Alexander, M. 2000. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 34:4259-4265.
- Amadori, E. 1993. The production and use of HCH. p. 11-13. In HCH and halogenated pesticides. State of art for risk assessment and technology development. IWU, Magdeburgo.
- Assaf-Anid, N., K.F. Hayes and T.M. Vogel. 1994. Reduction dechlorination of carbon tetrachloride by cobalamin(II) in the presence of dithiothreitol: Mechanistic study, effect of redox potential and pH. *Environ. Sci. Technol.* 28:246-252.
- Bachmann, A., P. Walet, P. Wijnen, W. De Bruin, J.L.M. Huntjens, W. Roelofsen and A.J.B. Zehnder. 1988. Biodegradation of alpha- and beta-hexachlorocyclohexane in a soil slurry under different redox conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:143-149.
- Bedos, C., P. Cellier, R. Calvet, E. Barriuso and B. Gabrielle. 2002. Mass transfer of pesticides into the atmosphere by volatilization from soils and plants: Overview. *Agronomie.* 22:21-33.
- Benoit, P., E. Barriuso, S. Houot and R. Calvet. 1996. Influence of the nature of soil organic matter on the sorption-desorption of 4-chlorophenol, 2,4-dichlorophenol and the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Eur. J. Soil Sci.* 47:567-578.
- Bidleman, T.F. 1988. Atmospheric processes. *Environ. Sci. Technol.* 22:361-367.
- Bowman, B.T. 1989. Mobility and persistence of the herbicides atrazine, metolachlor, and terbutylazine in plainfield sand determined using field lysimeters. *Environ. Toxicol. Chem.* 8:485-491.

- Breivik, K., J.M. Pacyna and J. Münch. 1999. Use of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane in Europe, 1970-1996. *Sci. Total Environ.* 239:151-163.
- Burner, H., S. Crosswell, K. Kaufman, S. O'Rourke and L. Shelton. 1997. Movement of Pesticides and Best Management Practices. Groundwater Pollution Primer. ([www.cee.vt.edu](http://www.cee.vt.edu))
- Buser, H. and M.D. Müller. 1995. Isomer and enantioselective degradation of hexachlorocyclohexane isomers in sewage sludge under anaerobic conditions. *Environ. Sci. Technol.* 29:664-672.
- Calvelo Pereira, R. 2008. Estudio del comportamiento del Hexaclorociclohexano en el sistema suelo-planta para su aplicación en técnicas de fitocorrección. Tesis Doctoral. Departamento de Edafología y Química Agrícola, Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela.
- Chiou, C.T. 1989. Theoretical considerations of the partition uptake of nonionic organic compounds by soil organic matter. *SSSA Special Publication.* 22:1-29.
- Chiu, P. and M. Reinhard. 1995. Metallocoenzyme-mediated reductive transformation of carbon tetrachloride in titanium(III) citrate aqueous solution. *Environ. Sci. Technol.* 29:595-603.
- Clayton, G.D., F.E. Clayton and Editors. 1981. *Patty's industrial hygiene and toxicology*, vol. 2B: Toxicology. 3rd ed.
- Cornejo, J. and F. Moreno. 1998. Dinámica de agroquímicos y otros contaminantes en el suelo. p. 275-294. In R.M. Jimenez Díaz and J. Lamo de Espinosa (eds.) *Agricultura sostenible*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Cox, L., M.C. Hermosin and J. Cornejo. 1993. Adsorption of methomyl by soils of southern Spain and soil components. *Chemosphere* 27:837-849.



- Datta, J., A.K. Maiti, D.P. Modak, P.K. Chakrabartty, P. Bhattacharyya and P.K. Ray. 2000. Metabolism of  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane by *arthrobacter citreus* strain BI-100: Identification of metabolites. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 46:59-67.
- Galván Lopez, V. 1998. HCH and lindane: differences and similarities. p. 55-62. In IHOBE (ed.), 5th International HCH and Pesticides Forum Book. Bilbao.
- Hermosin, M.C. and J. Cornejo. 1991. Soil adsorption of 2,4-D as affected by the clay mineralogy. *Toxicol. Environ. Chem.* 31-32:69-77.
- Hermosin, M.C., I. Roldan and J. Cornejo. 1991. Adsorption-desorption of maleic hydrazide on mineral soil components. *J. Environ. Sci. Health B.* 26:165-183.
- Hollifield, H.C. 1979. Rapid nephelometric estimate of water solubility of highly insoluble organic chemicals of environmental interest. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 23:579-586.
- Horstmann, M. and M.S. McLachlan. 1996. Evidence of a novel mechanism of semivolatile organic compound deposition in coniferous forests. *Environ. Sci. Technol.* 30:1794-1796.
- Jagnow, G., K. Haider and P.C. Ellwardt. 1977. Anaerobic dechlorination and degradation of hexachlorocyclohexane isomers by anaerobic and facultative anaerobic bacteria. *Arch. Microbiol.* 115:285-292.
- Johri, A.K., M. Dua, D. Tuteja, R. Saxena, D.M. Saxena and R. Lal. 1998. Degradation of alpha, beta, gamma and delta-hexachlorocyclohexanes by *sphingomonas paucimobilis*. *Biotechnol. Lett.* 20:885-887.
- Koskinen, W.C. and S.S. Harper. 1990. The retention process: Mechanisms. In H.H. Cheng (ed.) *Pesticides in the soil environment: Processes, impacts, and modeling*. Soil Science of America, Inc., Wisconsin.

- Kostoff, D. 1948. Atypical growth, abnormal mitosis, polyploidy and chromosome fragmentation induced by hexachlorocyclohexane. *Nature*. 162:845.
- Kuhn, E.P. and J.M. Suflita. 1989. Dehalogenation of pesticides by anaerobic microorganisms in soils and groundwater – A review. p. 111-180. In B.L. Sawhney and K. Brown (eds.) *Reactions and movements of organic chemicals in soils*. SSSA and ASA, Madison.
- Kurihara, N., M. Uchida, T. Fujita and M. Nakajima. 1973. Studies on BHC isomers and related compounds V. some physicochemical properties of BHC isomers (1). *Pestic. Biochem. Physiol.* 2:383-390.
- Lewis, T.A., M.J. Morra and P.D. Brown. 1996. Comparative product analysis of carbon tetrachloride dehalogenation catalyzed by cobalt corrins in the presence of thiol or titanium(III) reducing agents. *Environ. Sci. Technol.* 30:292-300.
- Li, Y. and J. Vijgen. 2006. Global lindane usage. p. 35-60. In J. Vijgen (ed.) *The legacy of lindane HCH isomer production*. International HCH & Pesticides Association (IHPA).
- Li, Y.F. 1999. Global technical hexachlorocyclohexane usage and its contamination consequences in the environment: from 1948 to 1997. *Sci. Total Environ.* 232:121-158.
- Li, Y.F. and R.W. Macdonald. 2005. Sources and pathways of selected organochlorine pesticides to the arctic and the effect of pathway divergence on HCH trends in biota: A review. *Sci. Total Environ.* 342:87-106.
- Li, Y.F., T.F. Bidleman, L.A. Barrie and L.L. McConnell. 1998. Global hexachlorocyclohexane use trends and their impact on the arctic atmospheric environment. *Geophys. Res. Lett.* 25:39-41.

- Li, Y.F., R.W. Macdonald, L.M.M. Jantunen, T. Harner, T.F. Bidleman and W.M.J. Strachan. 2002. The transport of beta -hexachlorocyclohexane to the western arctic ocean: A contrast to alpha -HCH. *Sci. Total Environ.* 291:229-246.
- Mackay, D., W.Y. Shiu and K. Ma. 1997. Illustrated handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals. Volume V: Pesticides. Lewis Publishers/CRC Press New York, New York.
- Marks, T.S., J.D. Allpress and A. Maule. 1989. Dehalogenation of lindane by a variety of porphyrins and corrins. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1258-1261.
- Matolcsy, G., M. Nádasz and V. Andruska. 1988. *Pesticide Chemistry*. Elsevier. Amsterdam.
- Mazumder, T.K., N. Nishio, S. Fukazaki and S. Nagai. 1987. Production of extracellular vitamin B12 compounds from methanol by *methanosarcina barkeri*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26:511-516.
- Middeldorp, P.J.M., M. Jaspers, A.J.B. Zehnder and G. Schraa. 1996. Biotransformation of a-, b-, g-, and d-hexachlorocyclohexane under methanogenic conditions. *Environ. Sci. Technol.* 30:2345-2349.
- Miya, R.K. and M.K. Firestone. 2001. Enhanced phenanthrene biodegradation in soil by slender oat root exudates and root debris. *J. Environ. Qual.* 30:1911-1918.
- Monterroso Martínez, M.C. 2006. Degradación, contaminación y descontaminación de suelos. p. 103-173. In F. Rodríguez Iglesias (ed.) *Ecología. Tomo XLVIII. Ciencia y Tecnología Ambientales II*. Hércules de Ediciones, Galicia.
- Mougin, C., C. Pericaud, C. Malosse, C. Laugero and M. Asther. 1996. Biotransformation of the insecticide lindane by the white rot basidiomycete *phanerochaete chrysosporium*. *Pestic. Sci.* 47:51-59.

- Muir, D.C.G., M.D. Segstro, P.M. Welbourn, D. Toom, S.J. Eisenreich, C.R. Macdonald and D.M. Whelpdale. 1993. Patterns of accumulation of airborne organochlorine contaminants in lichens from the upper great lakes region of ontario. *Environ. Sci. Technol.* 27:1201-1210.
- Newman, L.A. and C.M. Reynolds. 2004. Phytodegradation of organic compounds. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15:225-230.
- Pignatello, J.J. and B. Xing. 1996. Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. *Environ. Sci. Technol.* 30:1-11.
- Prager, J. C. 1995. Environmental Contaminant reference book. Volume I. Van Nostrand Reinhold. New York, NY.
- Reinhard, M., M. Semadeni, P.K. Sharma and W.R. Haag. 1999. Dehalogenation of haloaliphatic hydrocarbon compounds in the aquatic and terrestrial environment. p. 133-174. In D.C. Adriano, J. Bollag, W.T. Frankenberger Jr. and R.C. Sims (eds.) *Bioremediation of contaminated soils*. Agronomy Monograph no. 37. Madison, Wisconsin.
- Rodriguez-Garrido, B., M.C. Arbestain, M.C. Monterroso and F. Macias. 2004. Reductive dechlorination of alpha -, beta -, delta -, and gamma - hexachlorocyclohexane isomers by hydroxocobalamin in the presence of either dithiothreitol or titanium(III) citrate as reducing agents. *Environ. Sci. Technol.* 38:5046-5052.
- Rulkens, W. 1993. Alternatives and perspectives of technical solutions. p. 156-160. In *HCH and halogenated pesticides. state of art for risk assessment and technology development*. IWU, Magdeburgo.
- Sahu, S.K., K.K. Patnaik, S. Bhuyan, B. Sreedharan, N. Kurihara, T.K. Adhya and N. Sethunathan. 1995. Mineralization of alpha-, gamma-, and beta-isomers of hexachlorocyclohexane by a soil bacterium under aerobic conditions. *J. Agric. Food Chem.* 43:833-837.
- Scheunert, I. 1992. Transformation and degradation of pesticides in soil. *Chem. Plant. Protect.* 8:23-75.

- Schulten, H., M. Thomsen and L. Carlsen. 2001. Humic complexes of diethyl phthalate: Molecular modelling of sorption process. *Chemosphere* 45:357-369.
- Semple, K.T., A.W.J. Morriss and G.I. Paton. 2003. Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: Fundamental concepts and techniques for analysis. *Eur. J. Soil Sci.* 54:809-818.
- Senesi, N. 1992. Binding mechanisms of pesticides to soil humic substances. *Sci. Total Environ.* 123/124:347-377.
- Simonich, S.L. and R.A. Hites. 1995. Global distribution of persistent organochlorine compounds. *Science*. 269:1851-1854.
- Sims, J.L., J.M. Suflita and H.H. Russell. 1991. Ground Water Issue: Reductive dehalogenation of organic contaminants in soils and groundwater. United States Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Washington D.C.
- Singh, B.K. and R.C. Kuhad. 1999. Biodegradation of lindane (gamma - hexachlorocyclohexane) by the white-rot fungus *trametes hirsutus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 28:238-241.
- Smith, A.G. 1991 Chlorinated hydrocarbon insecticides. Classes of pesticides. p. 731-915. In W.J. Hayes and E.R. Laws (eds). *Handbook of pesticide toxicology*. Academic Press. San Diego, CA.
- Suntio, L.R., W.Y. Shiu, D. Mackay, J.N. Seiber and D. Glotfelty. 1988. Critical review of henry's law constants for pesticides. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 103:1-59.
- Tejedor Gilmartin, M.C., M.A. Murado Garcia and G. Baluja Marcos. 1974. Contamination of the environment by chlorinated hydrocarbons. VIII. adsorption-desorption process of lindane and aldrin in an agricultural soil and in its humic and clay components. *Anales de Química*. 70:1177-1183.

- USC. 2003. Evaluación y bioremediación de suelos contaminados con isómeros de HCH en el Polígono de Torneiros, Porriño (Pontevedra). Informe Final de Proyecto. Universidad de Santiago de Compostela, .
- van Eekert, M.H.A., T.J. Schröder, A.J.M. Stams, G. Schraa and J.A. Field. 1998a. Degradation and fate of carbon tetrachloride in unadapted methanogenic granular sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2350-2356.
- van Eekert, M.H.A., N.J.P. Van Ras, G.H. Mentink, H.H.M. Rijnaarts, A.J.M. Stams, J.A. Field and G. Schraa. 1998b. Anaerobic transformation of *b*-hexachlorocyclohexane by methanogenic granular sludge and soil microflora. *Environ. Sci. Technol.* 32:3299-3304.
- Wahid, P.A. and N. Sethunathan. 1979. Sorption-desorption of  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  isomers of hexachlorocyclohexane in soils. *J. Agric. Food Chem.* 27:1050-1053.
- Walker, K., D.A. Vallero and R.G. Lewis. 1999. Factors influencing the distribution of lindane and other hexachlorocyclohexanes in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 33:4373-4378.
- Wauchope, R.D. 1978. The pesticide content of surface water draining from agricultural fields - a review. *J. Environ. Qual.* 7:459-472.
- Wauchope, R.D., S. Yeh, J.B.H.J. Linders, R. Kloskowski, K. Tanaka, B. Rubin, A. Katayama, W. Kordel, Z. Gerstl, M. Lane and J.B. Unsworth. 2002. Pesticide soil sorption parameters: Theory, measurement, uses, limitations and reliability. *Pest. Manag. Sci.* 58:419-445.
- Weber, J.B. and C.T. Miller. 1989. Organic chemical movement over and through soil. p. 305-334. In B.L. Sawhney and K.W. Brown (eds.) *Reactions and movement of organic chemicals in soils*. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin.

- White, J.C., M.I. Mattina, W. Lee, B.D. Eitzer and W.Iannucci-Berger. 2003. Role of organic acids in enhancing the desorption and uptake of weathered p,p'-DDE by cucurbita pepo. Environ. Pollut. 124:71-80.
- WHO, World Health Organization. 1991. Lindane. Environmental Health Criteria 124. Ginebra.
- WHO, World Health Organization. 1992. Alpha and Beta-Hexachlorocyclohexane. Environmental Health Criteria 123. Ginebra
- Willett, K.L., E.M. Ulrich and R.A. Hites. 1998. Differential toxicity and environmental fates of hexachlorocyclohexane isomers. Environ. Sci. Technol. 32:2197-2207.

# Capítulo 1

*Estudio de la  
contaminación en el  
polígono de Torneiros  
(O Porriño)*





## Resumen

El HCH (hexaclorociclohexano) es un compuesto organoclorado del que existen ocho isómeros geométricos diferentes. De ellos, el isómero  $\gamma$ -HCH o lindano tiene propiedades insecticidas. Durante el proceso de fabricación del lindano se generan grandes cantidades de residuos, formados por los isómeros no pesticidas ( $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\delta$ , principalmente), que durante años fueron vertidos de forma incontrolada, provocando importantes focos de contaminación, uno de ellos localizado en el Polígono de Torneiros (Pontevedra).

En este trabajo se caracterizaron distintos sistemas contaminados de esta zona, con el objetivo de determinar el tipo, niveles y distribución de la contaminación, y su comportamiento en el medio edáfico. Para ello se realizaron: a) estudios de lixiviación de HCH a partir del “residuo bruto” recogido de una zona de acumulación actualmente confinada, b) un estudio de suelos contaminados en una parcela experimental y c) un estudio de detalle para evaluar la biodisponibilidad de los isómeros de HCH. El residuo bruto contenía una elevada proporción de  $\alpha$ -HCH (78%), con importantes cantidades de  $\beta$ -HCH (16%), y  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH en menor proporción (4 y 2%, respectivamente). Los lixiviados de este residuo, obtenidos en condiciones de laboratorio, reflejaban una solubilidad relativamente elevada de los isómeros  $\gamma$ - y sobre todo  $\delta$ -HCH, respecto a  $\alpha$ - y  $\beta$ -HCH, y presentaban un efecto tóxico para bacterias fotoluminiscentes. La contaminación en una parcela experimental (PV4) tenía una distribución heterogénea tanto horizontal como verticalmente, aunque el movimiento en el perfil era limitado.

### Introducción

El término contaminante orgánico hidrofóbico (COH) es un término genérico que incluye a un gran cantidad de compuestos orgánicos poco solubles en agua y bastante resistentes a la degradación biológica, química y fotolítica (Semple et al., 2003). El lindano ( $\gamma$ -hexaclorociclohexano o  $\gamma$ -HCH) es un pesticida organoclorado de amplio espectro que se ha usado extensivamente para el control de plagas en agricultura y medicina (Li et al., 1998). El lindano se obtiene del refinamiento de HCH-técnico, dando como resultado una elevada cantidad de residuos de HCH que contienen principalmente los isómeros  $\alpha$ -HCH y  $\beta$ -HCH que, junto al lindano, se convierten en contaminantes medioambientales clasificados por la OMS como "moderadamente peligrosos" (OMS, 1991) debido a su naturaleza altamente persistente y a su toxicidad (Abhilash et al., 2008; Willett et al., 1998). Debido a su uso generalizado, los isómeros del HCH han penetrado en casi todos los ecosistemas (Walker et al., 1999), lo que ha dado lugar a un problema medioambiental mundial. La mayoría de los países han prohibido el uso de  $\gamma$ -HCH, pero en algunos aún se sigue utilizando por razones económicas y, por tanto, siguen apareciendo nuevos focos de contaminación.

En el polígono de Torneiros (Porriño-Pontevedra) se ha localizado una zona contaminada por isómeros de HCH procedentes del vertido incontrolado de la fabricación de lindano. El inicio de estos vertidos tuvo lugar en torno a los años 1948-1954 y se prolongaron hasta el año 1964. Posteriormente, tuvo lugar un esparcimiento por todo el terreno de los residuos depositados, como consecuencia del allanamiento mecánico del lugar, asociado a la construcción de diferentes infraestructuras viarias y urbanísticas en el entorno (Eptisa, 1999). Además, el material abandonado en los vertederos se reutilizó para diferentes usos: pesticida, mejora de viales, recebo de sótanos, bodegas, almacenes, etc., lo que ocasionó la formación de numerosos núcleos secundarios de contaminación en diferentes lugares, como el campo de juegos anexo a una escuela en la vega del río Louro, relleno de la construcción de las autovías a Madrid y Portugal, etc. La zona contaminada tenía una extensión de unas 4,3 hectáreas y la contaminación alcanzaba en algunos puntos más de 6 metros de profundidad.

Los contaminantes predominantes son los isómeros  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH, siendo el isómero  $\alpha$ -HCH el mayoritario, seguido del  $\beta$ -HCH. Aparecen distribuidos de forma heterogénea en toda el área afectada desconociéndose con precisión su distribución espacial y el grado de transformación experimentado por acción de la intemperie y los microorganismos del suelo. Los cuatro isómeros fueron detectados también en el acuífero, lo que demuestra la lixiviabilidad de estos compuestos a pesar de su baja solubilidad en agua. Tras una primera fase de estudio, la alternativa seleccionada por la Xunta de Galicia como primera medida de control para dicho foco de contaminación fue el confinamiento de la zona más contaminada mediante una celda de seguridad *in situ* en la que se construyó una pantalla perimetral impermeable (900 m de perímetro) de cemento-bentonita, así como la impermeabilización superficial del área contaminada con diferentes geotextiles y capas de arena para el drenaje. Además, la Xunta de Galicia impulsó diferentes trabajos de investigación con el objeto de estudiar el comportamiento ambiental de los isómeros de HCH y desarrollar técnicas de limpieza basadas en procesos biológicos (biocorrección).

El suelo juega un papel muy importante en el destino y comportamiento de los COHs y es el principal sumidero medioambiental de estos compuestos (Semple et al., 2003). Después de llegar al suelo los contaminantes orgánicos pueden eliminarse por degradación, lixiviación o volatilización, o pueden acumularse en la biota del suelo o ser retenidos en las fracciones mineral o materia orgánica del suelo. El destino y comportamiento de los COHs en el suelo está controlado por varios factores, incluyendo el tipo de suelo (principalmente contenido y naturaleza de la materia orgánica y mineral) y las propiedades fisicoquímicas de los contaminantes (solubilidad en agua, polaridad, lipofilicidad, estructura molecular, etc.) (Reid et al., 2000; Semple et al., 2003).

La movilidad y biodisponibilidad de los contaminantes es un factor clave que determina su transferencia al medio hídrico y biológico y condiciona el resultado final de las técnicas de biocorrección. El término **biodisponibilidad** se refiere a la fracción de un compuesto accesible a organismos vivos, para su asimilación, transformación o posible toxicidad (Alexander, 2000). Según aumenta el tiempo de contacto ente los contaminantes orgánicos y el suelo la

biodisponibilidad disminuye, a este fenómeno se le conoce como envejecimiento o efecto “aging” (Alexander, 2000). Si bien el proceso natural de la retención de COHs en el suelo disminuye su biodisponibilidad y, por tanto, la eficiencia de las acciones de biocorrección que se puedan llevar a cabo (Pignatello and Xing, 1996), este proceso puede contemplarse como una vía mediante la cual se reduce el riesgo de toxicidad y lixiviabilidad de los mismos (Kanazawa, 1989).

Los métodos analíticos utilizados para cuantificar la cantidad de contaminante presente en un suelo pretenden extraer la máxima cantidad de contaminante presente. Para ello, generalmente, se usan condiciones de extracción muy vigorosa con disolventes orgánicos, sin embargo, el efecto “aging” provoca la reducción de la extractabilidad del contaminante y la concentración total es a veces infraestimada. Por otro lado, estos métodos no nos dan una idea de la cantidad de contaminante biodisponible, y generalmente no reflejan la disminución de la disponibilidad con el tiempo, de este modo se puede sobreestimar la magnitud del riesgo medioambiental y social de estos contaminantes (Alexander, 2000). La investigación del comportamiento y la biodisponibilidad de contaminantes en el suelo es esencial para entender el riesgo que representa un contaminante y los medios requeridos para una corrección acertada (Semple et al., 2003); por ello, es necesario evaluar los métodos de lixiviación y extracción que nos den una idea de la concentración de contaminante biodisponible.

El principal objetivo de este trabajo es caracterizar desde distintos puntos de vista los sistemas contaminados del área de Porriño: tipo, niveles y distribución de la contaminación, comportamiento de los isómeros de HCH en el medio, ecotoxicidad, propiedades de los suelos contaminados y biodisponibilidad de los isómeros de HCH. Adicionalmente, se pretende evaluar la eficiencia de distintos métodos en la determinación del contenido “total” y “biodisponible” de HCH en el suelo. Para ello se realizaron tres estudios específicos: 1º) lixiviación de isómeros de HCH a partir de residuo bruto recogido en la zona actualmente confinada, 2º) estudio de suelos contaminados en una parcela experimental y 3º) estudio de detalle para evaluar el contenido “total” y “biodisponible” de HCH.

## Material y métodos

### Estudio de lixiviación

#### *Muestras utilizadas*

Para el estudio de lixiviabilidad y ecotoxicidad se utilizó una muestra de residuo de isómeros de HCH de la zona más contaminada del polígono de Torneiros (Porriño, Pontevedra), recogida antes de su confinamiento en la celda de seguridad (A1, Figura 1.1). Este residuo, denominado a partir de ahora “residuo bruto”, fue recogido con equipos de protección individual. Se secó al aire y se sometió a tamizados sucesivos, obteniendo las siguientes fracciones granulométricas: >8 mm; 4-8 mm; 2-4 mm; 1-2 mm; 0,5-1 mm; 0,2-0,5 mm; 0,05-0,2 mm y <0,05 mm. En cada una de estas fracciones se realizó la extracción de los isómeros de HCH usando 0,4 g de muestra y 30 mL de hexano:acetona (1:1) en ultrasonidos y la cuantificación mediante análisis cromatográfico (Concha-Graña et al., 2006). Además, en cada una de las fracciones se realizó un ensayo de lixiviación.

**Figura 1.1:**  
Localización de los emplazamientos contaminados (PV1 a PV4) y puntos de fabricación (emplazamientos 1 y 2) de HCH del polígono de Torneiros.



### *Ensayos de lixiviación*

El procedimiento usado para simular la lixiviación que un residuo puede sufrir en un terreno fue el recomendado en la orden del 13 de octubre de 1989 para la determinación de los métodos de caracterización de los residuos tóxicos y peligrosos (B.O.E. N° 270 de 10 de noviembre de 1989). Se preparó una suspensión con 100 gramos de residuo + 16 veces su peso de agua y se sometió a agitación durante 24 horas. Durante las 6 primeras horas se ajustó el pH a  $5 \pm 0,2$  cada media hora, añadiendo ácido acético (AcH) 0,5N en el caso de que el pH fuese mayor de 5,2 (la cantidad de AcH añadido no debía superar los 4 ml por gramo de sólido). Al pasar las 24 horas de extracción todos los lixiviados estaban a pH entre 4,8 y 5,2. Por último, se ajustó el volumen con agua hasta obtener una relación disolución acuosa:suelo 20:1 (peso:peso) y los lixiviados se filtraron por  $0,45 \mu\text{m}$  con filtros de fibra de vidrio. Cada lixiviado se separó en dos partes; una para los test de ecotoxicidad y otra para la extracción y análisis cromatográfico de HCH. A esta última se le añadió un 20% de metanol para su conservación. Todos los lixiviados se conservaron en nevera a 4°C.

### *Test de ecotoxicidad de los lixiviados*

Los test biológicos de toxicidad permiten observar el impacto de un determinado agente tóxico sobre la viabilidad de un ser vivo. En la normativa vigente para la caracterización de Residuos Tóxicos y Peligrosos (RTP) se utiliza como índice ecotoxicológico la concentración de lixiviado que provoca un 50% de mortandad ( $\text{EC}_{50}$ ) en un cultivo de bacterias luminiscentes *Photobacterium phosphoreum* (B.O.E. N° 270, 1989).

La reacción de emisión de luz de esta bacteria está basada en la oxidación conjunta por acción de una luciferasa bacteriana ( $\text{FMNH}_2$ ) procedente de la cadena transportadora de electrones (núcleo central del mecanismo de obtención de energía celular) y un aldehído de cadena larga. La estrecha relación existente entre el mecanismo de emisión de luz y el metabolismo celular es el fundamento del test de toxicidad. Cualquier sustancia presente en el medio que pueda alterar (intoxicar) el metabolismo celular va a inducir una caída en la emisión de luz de la bacteria, que es proporcional a la toxicidad de la muestra y a la concentración de agentes tóxicos. La emisión de luz se cuantificó con un luminómetro (MGM,

Optocomp I). La reacción de oxidación entre FMNH<sub>2</sub> y el aldehído es (Ramos Prieto, 1996):



Para realizar el test de ecotoxicidad se hizo una reconstitución de las bacterias luminiscentes en NaCl al 2%. Luego se preparó una mezcla 1:1 de disolución de bacterias y lixiviado, se dejó incubando a 15 °C durante 15 minutos y se midió la disminución de luminiscencia (o porcentaje de inhibición bacteriana) producida por los lixiviados. Posteriormente se realizó el ensayo de EC<sub>50</sub> en aquellas muestras que mostraron un porcentaje de inhibición de bacterias superior al 20%. Para ello se prepararon diferentes diluciones de la muestra que luego se mezclaron con la bacteria y se midió de nuevo la luminiscencia después de 15 minutos de incubación, calculando la concentración de muestra que produce un descenso del 50% de la luminiscencia. La orden del 13 de octubre de 1989 que desarrolla Métodos de caracterización de residuos Tóxicos y Peligrosos (B.O.E. N° 270, 1989) establece que un residuo es tóxico si su lixiviado presenta una EC<sub>50</sub> igual o inferior a 3 g/litro (0,3%).

### *Extracción y cuantificación de los isómeros de HCH en lixiviados*

Se realizó una extracción de 0,5 ml de lixiviado con 10 ml de hexano:acetona (1:1) en un baño de ultrasonidos durante 30 minutos, la fase orgánica se secó con sulfato sódico anhidro y se conservó en nevera para su posterior análisis cromatográfico.

La identificación y cuantificación los isómeros de HCH se realizó usando un cromatógrafo de gases (modelo GC 8532 Mega 2 series, Fisons Instruments, Milán, Italia), equipado con un ECD (detector de captura electrónica, modelo ECD 850, Thermo Quest, Milán, Italia) y un muestreador automático (modelo AS 800, Fisons Instruments, Milán, Italia). Trabajamos con un inyector de split/splitless en modo splitless y el volumen de inyección fue de 1 µl. Para la separación se usó una columna capilar BP×35 de sílice fundida de 0,25 mm × 30 m. Como gas portador se usó helio, con una presión de 115 KPa y como gas auxiliar del detector N<sub>2</sub>, con una presión de 105 KPa. La temperatura del



inyector fue de 270 °C y la del detector de 300°C. Se trabajó en condiciones de gradiente de temperatura, el programa utilizado fue: 60 °C (1 min), una rampa de temperatura de 30 °C min<sup>-1</sup> hasta alcanzar los 180 °C, luego hasta 230 °C con una rampa de 6 °C min<sup>-1</sup> y finalmente con una rampa de 30 °C min<sup>-1</sup>, hasta 270 °C (4 min), al terminar la temperatura descendía de nuevo a 60 °C. Los isómeros analizados fueron  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH, siendo  $\Sigma$ -HCH la suma de sus concentraciones.

### Estudio de los suelos contaminados de la parcela PV4

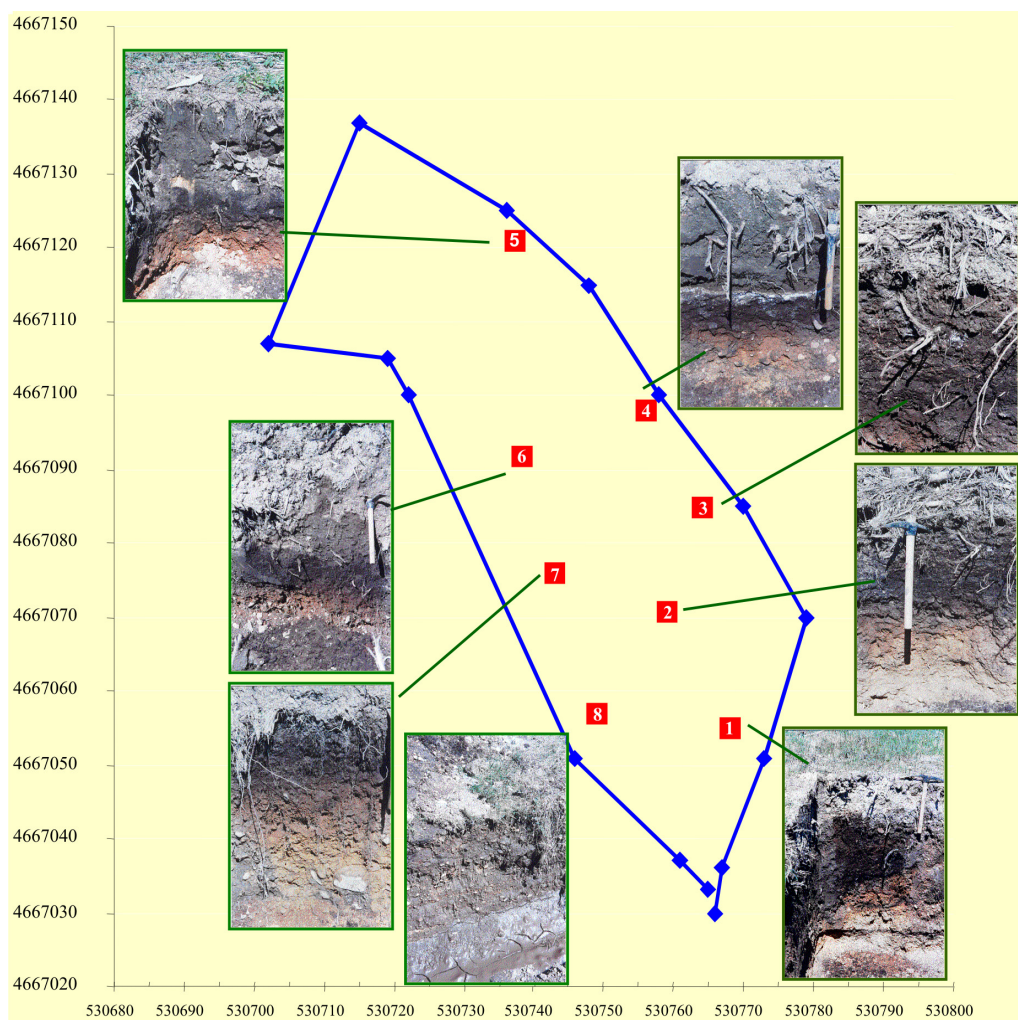
#### *Parcela experimental (PV4)*

En el momento de inicio de los trabajos de campo la parcela experimental PV4 (Figura 1.1) presentaba un aspecto muy heterogéneo con relación a la vegetación, materiales superficiales, topografía y condiciones hídricas y por ello fue necesario desbrozar la vegetación y allanar la superficie de la parcela. Después de esto, en la parcela de estudio (Foto 1.1) se abrieron 8 calicatas de 1,5 m de profundidad (Figura 1.2), en las que se realizó la descripción del suelo y se tomó muestra de los distintos horizontes para su caracterización. Durante la inspección de los perfiles se constató que la contaminación de isómeros de HCH estaba distribuida heterogéneamente tanto vertical como horizontalmente, y se localizaron visualmente las áreas más contaminadas de esta parcela (Figura 1.3). En cada horizonte se tomaron 1 ó 2 muestras representativas y se cerraron herméticamente para su transporte. El perfil C4 se muestreó con más intensidad para hacer un estudio de mayor detalle.

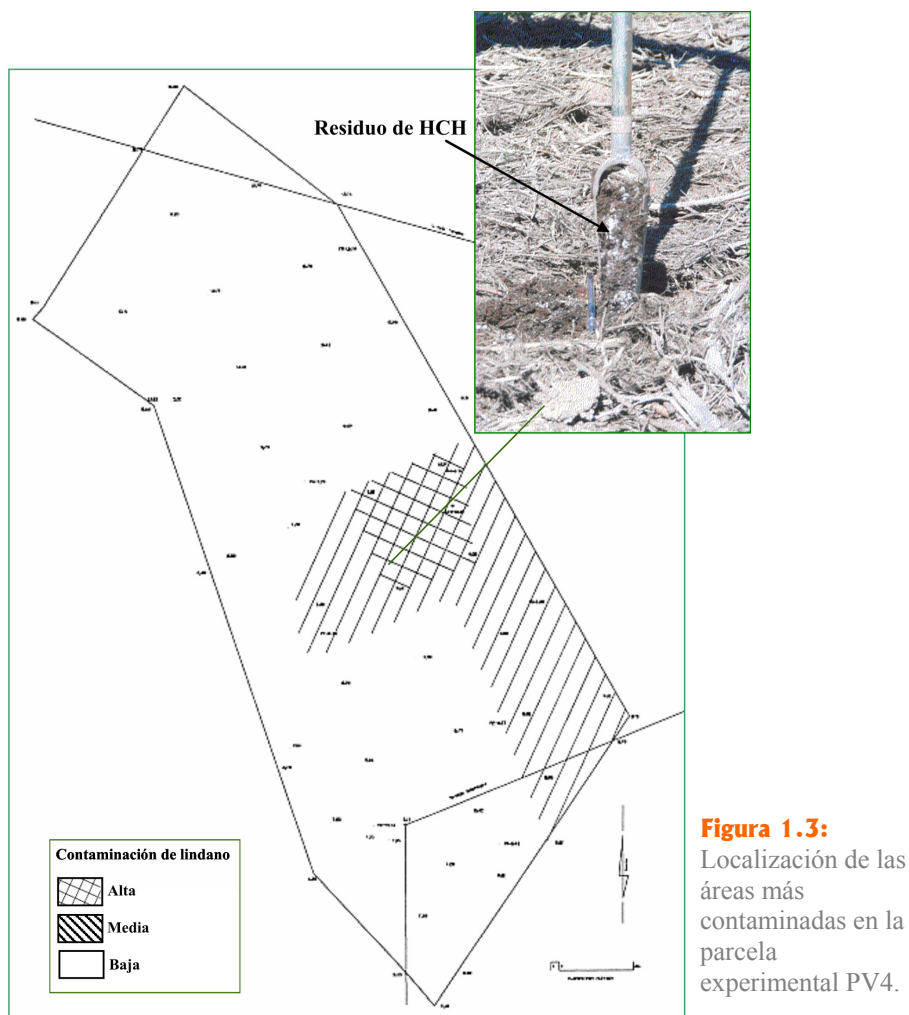


**Foto 1.1:**

Parcela PV4 después del acondicionamiento.



**Figura 1.2:**  
Situación de las 8 calicatas abiertas en la parcela experimental PV4.



### *Análisis de suelos*

Las muestras de suelo fueron secadas al aire y tamizadas por 2mm. Las medidas de pH se realizaron en  $H_2O$  y  $KCl$  0,1M (relación suelo:disolución 1:2,5); los contenidos de carbono orgánico y nitrógeno se analizaron por combustión en un analizador LECO (Model CHN-1000 LECO Corp., St Joseph, MI); la medida de los cationes de cambio (Ca, Mg, Na, K y Al) se realizó por espectrometría de absorción /emisión atómica de llama (Perkin Elmer 1100) tras

su extracción con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1M (Peech et al, 1947) y la capacidad de intercambio catiónico efectiva (CIC) se obtuvo por la suma de cationes. El fósforo disponible fue extraído con  $\text{NaHCO}_3$  y determinado por colorimetría tras la reacción con molibdato amónico/ácido ascórbico (Olsen and Sommers, 1982).

### *Extracción de los isómeros de HCH en suelos*

Para la estimación del contenido “total” de los isómeros de HCH en los suelos contaminados se realizó una extracción de 0,4 gramo de suelo con 30 ml de disolución hexano:acetona (1:1) en un baño de ultrasonidos durante 30 minutos, se filtró el sobrenadante y se enrasó a 50 ml con hexano:acetona. Los extractos se secaron con sulfato sódico anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) para eliminar la posible humedad que pudiera quedar en las muestras.

Para realizar la identificación y cuantificación de los diferentes isómeros de HCH se utilizó un cromatógrafo de gases Perkin Elmer® PE 8700 equipado con un detector de captura de electrones  $^{63}\text{Ni}$  (GC-ECD), un inyector de split/splitless y un inyector automático AS 2000B, conectado a un procesador de datos Turbochrom 4. La separación se realizó en una columna capilar de metil-fenil-cianosilicona 007-608 Quadrex® (30 m  $\times$  0,25 mm  $\times$  0,25  $\mu\text{m}$ ), específica para la separación de pesticidas. Como gas portador se utilizó helio, con una presión en cabeza de columna de 18 psi. La temperatura del inyector fue de 300 °C y la del detector de 350 °C. Se trabajó en condiciones de gradiente de temperatura, el programa utilizado fue: 60 °C (1 min), una rampa de temperatura de 25 °C  $\text{min}^{-1}$  hasta alcanzar los 220 °C, luego hasta 250 °C con una rampa de 6 °C  $\text{min}^{-1}$  y finalmente con una rampa de 30 °C  $\text{min}^{-1}$ , hasta 300 °C (4 min), al terminar la temperatura desciende de nuevo a 60 °C. Estos análisis se realizaron en el laboratorio del Departamento de Química Analítica de la Universidad de A Coruña.

### **Estudio de detalle del HCH**

En las muestras del perfil C4 de la parcela PV4 (Figura 1.2) se realizó una determinación alternativa para la cuantificación del contenido total de isómeros

de HCH y se analizó la fracción biodisponible. En este estudio de detalle se han excluido las muestras C4 IV y C4 XL por su elevado contenido de HCH.

Para el análisis del contenido total de isómeros de HCH se realizó una extracción con líquidos a presión usando un equipo ASE<sup>®</sup> 200 (Accelerated Solvent Extractor) (Dionex Co. Sunnyvale, CA, USA). Ésta es una técnica para extracción en muestras sólidas, en principio similar a la extracción soxhlet, pero la elevada presión y temperatura con ASE hace que la extracción sea completa en poco tiempo y con una menor cantidad de disolvente (Gan et al., 1999). Las extracciones se llevaron a cabo con 0,1 gramo de muestra mezclada y homogenizada con 10 gramos de arena de cuarzo, que se usa como agente dispersante y de relleno del hueco sobrante de la celda. A continuación la muestra se introdujo en una celda de aluminio de 11 ml a la que se colocó un filtro de fibra de vidrio. La extracción se realizó con hexano:acetona (1:1) a 100 °C, presión 2000 psi, 5 minutos de precalentamiento seguidos de 5 minutos de extracción estática y 60 segundos de tiempo de purga (método EPA 3545).

Adicionalmente, en estas muestras se compararon dos métodos diferentes para la determinación de la biodisponibilidad de los isómeros de HCH:

1. Una extracción con agua a presión usando el equipo ASE<sup>®</sup> 200. La extracción se realizó sobre 0,1 g de muestra mezclada y homogenizada con 10 gramos de arena de cuarzo. El método de extracción utilizado fue: agua destilada a 60 °C, presión 1500 psi, 5 minutos de precalentamiento seguidos de 5 minutos de extracción estática y 60 segundos de tiempo de purga. Los extractos acuosos obtenidos se extrajeron con hexano en ultrasonidos, para su posterior análisis cromatográfico.
2. Extracción de los isómeros de HCH con agua y amberlita XAD-2. La amberlita XAD-2 es una resina no polar, es un copolímero hidrofóbico de estireno-divinilbenceno que ha sido utilizado para la extracción y concentración de contaminantes orgánicos hidrofóbicos de muestras acuosas (Northcott and Jones, 2001). Para realizar el estudio de extracción de la fracción lábil de los isómeros de HCH en el suelo (fracción fácilmente disponible) se realizó una extracción en agua

usando una resina, XAD-2, como agente “secuestrante” de los isómeros de HCH. Para ello se usó 0,1 gramo de cada una de las muestras, 20 ml de agua destilada y 0,1 gramo de resina, y se dejó durante 24 horas en agitación. La resina se introdujo en una bolsa de nylon, cuyo tamaño de poro no permitía que los granos de la misma salieran a la disolución, para facilitar su manipulación en los sucesivos pasos experimentales. Tras las 24 horas de agitación se extrajeron con hexano los isómeros de HCH retenidos en la resina dejando la mezcla 1 hora en ultrasonidos. Los extractos orgánicos se secaron con sulfato sódico anhidro y se conservaron en nevera para su posterior análisis cromatográfico.

La identificación y cuantificación de los isómeros de HCH se realizó usando un cromatógrafo de gases (modelo GC 8532 Mega 2 series, Fisons Instruments, Milán, Italia), equipado con un ECD (detector de captura electrónica, modelo ECD 850, Thermo Quest, Milán, Italia) y un muestreador automático (modelo AS 800, Fisons Instruments, Milán, Italia). Trabajamos con un inyector de split/splitless en modo splitless y el volumen de inyección fue de 1  $\mu$ l. Para la separación se usó una columna capilar BP $\times$ 35 de sílice fundida de 0,25 mm  $\times$  30 m. Como gas portador se usó helio, con una presión de 115 KPa y como gas auxiliar del detector N<sub>2</sub>, con una presión de 105 KPa. La temperatura del inyector fue de 270 °C y la del detector de 300°C. Se trabajó en condiciones de gradiente de temperatura, el programa utilizado fue: 60 °C (1 min), una rampa de temperatura de 30 °C min<sup>-1</sup> hasta alcanzar los 180 °C, luego hasta 230 °C con una rampa de 6 °C min<sup>-1</sup> y finalmente con una rampa de 30 °C min<sup>-1</sup>, hasta 270 °C (4 min), al terminar la temperatura descendía de nuevo a 60 °C.

## **Resultados y discusión**

### **Lixiviabilidad y ecotoxicidad de HCH**

El contenido  $\Sigma$ -HCH en las distintas fracciones granulométricas separadas del residuo recogido en el emplazamiento A1 variaba entre 23 y 219 g HCH kg<sup>-1</sup>, pero la proporción de los isómeros mayoritarios ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ - y  $\gamma$ -HCH) era siempre la misma, independientemente de la fracción granulométrica considerada (Figura 1.4 A). La contribución media de cada isómero era: 78%  $\alpha$ -HCH, 16% de  $\beta$ -HCH, 4%  $\gamma$ -HCH y 2% de  $\delta$ -HCH. Este residuo es el resultado del refinamiento de HCH-técnico, eso explica que el isómero gamma sea uno de los isómeros minoritarios y también el elevado porcentaje del isómero alfa.

Los ensayos de lixiviación acuosa realizados han permitido evaluar las diferencias de solubilidad de los distintos isómeros de HCH. Las concentraciones en disolución de los distintos isómeros oscilaron entre 3,9 y 5,9 mg  $\alpha$ -HCH L<sup>-1</sup>, 1,3 y 2,1 mg  $\beta$ -HCH L<sup>-1</sup>, 8,2 y 20,6 mg  $\gamma$ -HCH L<sup>-1</sup> y 21,9 y 38,6 mg  $\delta$ -HCH L<sup>-1</sup> (Figura 1.4 B). La distribución relativa de los distintos isómeros de HCH en los lixiviados resultante era completamente diferente a la composición del residuo sólido, siendo el isómero  $\delta$ -HCH (minoritario en la fase sólida del suelo) el componente mayoritario de los lixiviados, seguido de  $\gamma$ -HCH, mientras que los isómeros mayoritarios en la fracción sólida ( $\alpha$ - y  $\beta$ -HCH) son muy insolubles en agua, especialmente  $\beta$ -HCH. En valores medios  $\delta$ -HCH suponía un 60,9% de  $\Sigma$ -HCH,  $\gamma$ -HCH un 26,2%,  $\beta$ -HCH un 3,3% y  $\alpha$ -HCH un 9,5% (Figura 1.4 B).

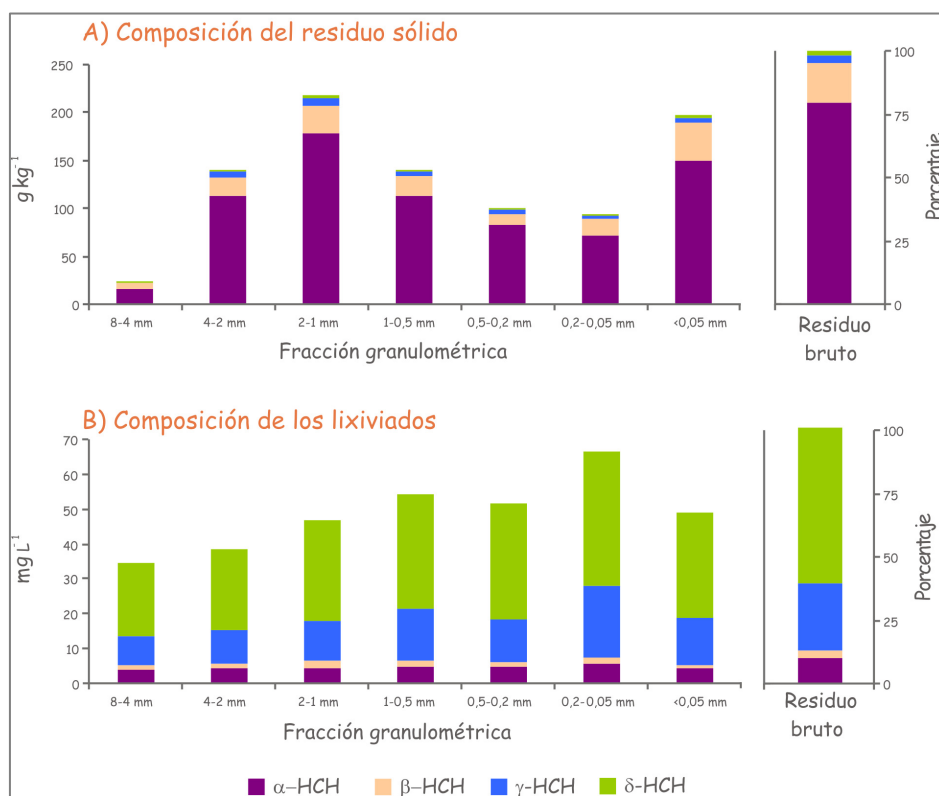
Las diferencias de solubilidades entre los cuatro isómeros se ponen de manifiesto más claramente si se calcula el porcentaje de isómero lixiviado respecto al total de la fracción sólida. En las condiciones en las que se realizaron los ensayos de lixiviación, se llegó a solubilizar hasta un 93% de  $\delta$ -HCH y entre un 3 y un 16% de  $\gamma$ -HCH, mientras que para los isómeros  $\alpha$ - y  $\beta$ -HCH no se llega al 0,5% de lixiviación. Debemos destacar que la concentración de los isómeros de HCH presentes en los lixiviados fue superior a la solubilidad teórica de los compuestos puros en agua, lo que indica que, probablemente, hay algún factor que está modificando la



solubilidad de los isómeros de HCH, como puede ser la presencia de materia orgánica disuelta o el efecto del ácido acético usado para ajustar el pH de los lixiviados.

De forma general, el contenido de  $\Sigma$ -HCH disuelto en los lixiviados aumentaba al disminuir el tamaño de partícula del residuo para las fracciones granulométricas comprendidas entre 8 y 0,05 mm (Figura 1.4 B), lo que se puede relacionar con el aumento de la superficie específica asociado al descenso de tamaño de partícula. Sin embargo, para la fracción más fina (<0,05 mm) la cantidad de HCH solubilizada era menor de la esperada, lo que apunta a algún proceso de retención de HCH en la fase sólida más fina, probablemente en la fracción arcilla (< 2 $\mu$ m).

**Figura 1.4:**  
Concentración y  
distribución  
relativa media de  
isómeros de  
HCH en las  
distintas  
fracciones  
granulométricas  
del residuo bruto  
de HCH (1.4 A)  
y los lixiviados  
correspondientes  
(1.4 B).





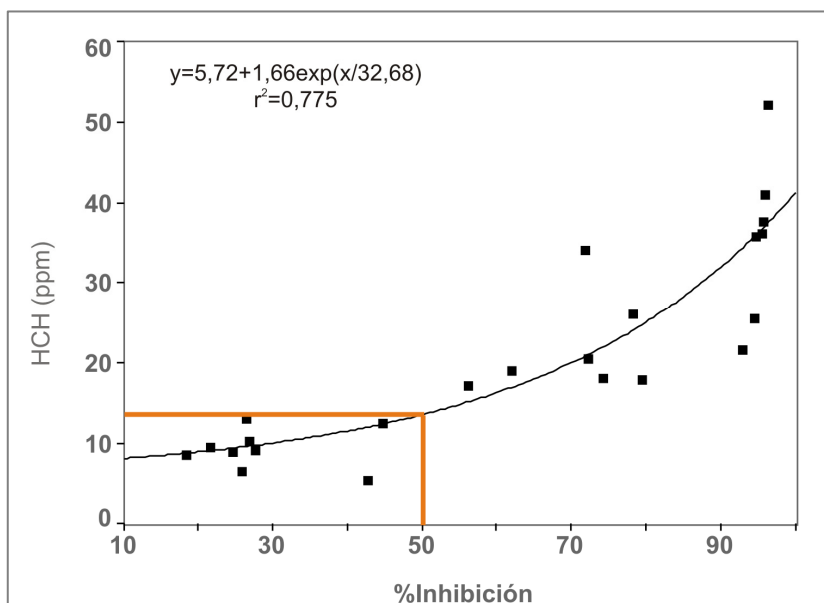
En cuanto al ensayo de ecotoxicidad de los lixiviados en la Tabla 1.1 se recogen los valores de la concentración de lixiviado que provoca la mortandad del 50% de las bacterias incubadas durante el test de ecotoxicidad ( $EC_{50}$ ). Los valores de  $EC_{50}$  fueron en todos los casos superiores a 3000 mg de lixiviado por litro de disolución (0,3%), es decir, el efecto ecotóxico de los lixiviados fue inferior al límite marcado como referencia en la legislación (B.O.E. Nº 270, 1989) para clasificar los residuos como tóxicos y peligrosos según este criterio. Sin embargo, el efecto tóxico de los isómeros de HCH sobre la bacteria se pone de manifiesto cuando representamos el porcentaje de inhibición del crecimiento de la bacteria luminiscente *Photobacterium phosphoreum* frente a la concentración de HCH en el lixiviado (Figura 1.5). Según la relación obtenida en estos ensayos, una concentración en torno a 15 mg  $\Sigma$ -HCH  $L^{-1}$  provocaría una inhibición bacteriana del 50%. No obstante, debido a que el efecto ecotóxico de los distintos isómeros puede ser diferente, este valor podría variar si varía la distribución de isómeros en el lixiviado.

**Tabla 1.1:**

Valores de  $EC_{50}$  de los lixiviados obtenidos de las distintas fracciones granulométricas del residuo bruto de la parcela A1.

Fracción	$EC_{50}$ (%)
8-4 mm	6,55
4-2 mm	13,50
2-1 mm	23,38
1-0,5 mm	14,63
0,5-0,2 mm	13,17
0,2-0,05 mm	12,72
<0,05 mm	9,65

**Figura 1.5:**  
Relación entre  
inhibición del  
crecimiento de la  
bacteria  
*Photobacterium  
phosphoreum* y la  
concentración de  
HCH total en los  
lixiviados obtenidos  
del residuo bruto de la  
parcela A1.



## Estudio de los suelos de la parcela PV4

### *Propiedades generales de los suelos*

El suelo original de la parcela PV4 deriva de sedimentos aluvio-coluviales recientes, de textura heterogénea con abundancia de fragmentos gruesos de origen granítico y cuarzo filoniano. Este lado está cubierto por material exógeno heterogéneo, transportado antrópicamente. El perfil “tipo” es ABC con horizontes bien diferenciados y de profundidad variable. La permeabilidad, aunque muy variable, parece limitada en profundidad, lo que se manifiesta por los frecuentes encharcamientos, especialmente de la parte más baja de la parcela. El drenaje lateral parece estar favorecido a través de las zonas con mayor abundancia de fragmentos gruesos. Estos suelos aparecen ocasionalmente en superficie pero, habitualmente, están enterrados por un horizonte A alóctono y otros materiales. En la zona de contacto entre los dos horizontes A (antigua superficie de la parcela) aparecen indicios de incendio (calicata 1), residuos de distinta naturaleza (plásticos, cristales, etc, en calicata 5) y una capa variable (en potencia y profundidad) de residuos visibles de HCH

(calicatas 3, 4 y 6) (Figura 1.2). Se trata de Tecnosoles Úrbicos y/o Regosoles Técnicos (IUSS Working Group, 2007).

En la Tabla 1.2 se recogen las propiedades fisicoquímicas de cada uno de los horizontes de las calicatas de la parcela PV4. En concordancia con la heterogeneidad de los suelos, las propiedades físico-químicas son muy variables, aunque en general son suelos ácidos, con baja capacidad de intercambio catiónico (CIC) y elevada saturación de aluminio en el complejo de cambio. El porcentaje de carbono de los horizontes superficiales oscila generalmente entre 2,1 y 7,1 y la relación C/N es siempre superior a 13, alcanzando valores de 24,8, lo que indica una mala humificación de la materia orgánica y, en algunos casos, refleja la contribución del HCH al carbono orgánico. En general, salvo en el perfil C5, el horizonte A superficial, identificado como alóctono, presenta menor acidez, mayor CIC, menor saturación de Al en el complejo de cambio y mayor cantidad de fósforo disponible que el horizonte 2A subyacente. Los valores más bajos de pH han sido obtenidos en las muestras en las que se han identificado visualmente restos de HCH (pH de 3,6 en C3 XL, 4,3 en C4 XL y 4,8 en C6 III).

**Tabla 1.2:** Propiedades físico-químicas de los suelos de la parcela PV4 de Porriño.

MUESTRA	Profundidad	Horizonte	pH agua	pH KCl	Al <sup>3+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup> cmole / kg	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	CICe	% Al cambio	% C	% N	C/N	Polsoen mg/kg
<b>C1 I</b>	0-20 (variable)	Ap (relleno)	4,96	4,02	3,36	1,23	0,25	0,46	0,18	5,48	61,31	1,12	0,03	37,3	1,0
<b>C1 II</b>	20-40 (variable)	2A	4,79	4,27	4,07	0,40	0,06	0,06	0,17	4,76	85,50	6,37	0,32	19,9	0,3
<b>C1 III</b>	40-60 (variable)	2BC	5,17	4,46	1,41	0,24	0,40	0,04	0,10	2,19	64,38	1,66	0,04	41,5	0,4
<b>C1 IV</b>	>60	2C	4,93	4,22	1,9	0,17	0,04	0,05	0,11	2,27	83,70	0,24	0,02	12,0	1,5
<b>C2 I</b>	0-15	Ap (relleno)	6,05	5,34	0,12	5,85	0,31	0,49	0,52	7,29	1,65	4,12	0,22	18,7	17,7
<b>C2 II</b>	15-40	2A	4,98	4,46	2,77	0,16	0,03	0,07	0,15	3,18	87,11	5,90	0,31	19,0	2,8
<b>C2 III</b>	40-60	2BC	4,87	4,41	1,31	0,15	0,02	0,08	0,09	1,65	79,39	0,89	0,04	22,3	1,7
<b>C2 IV</b>	>60	2C	4,84	4,32	0,74	0,14	0,03	0,13	0,09	1,13	65,49	0,65	0,03	21,7	1,4
<b>C3 I</b>	0-10	Ap (relleno)	5,02	4,59	1,31	3,50	0,32	0,09	0,63	5,85	22,39	5,17	0,33	15,7	12,0
<b>C3 II</b>	10-40 (discontinuo)	2A	4,6	4,36	3,51	0,22	0,03	0,09	0,06	3,91	89,77	7,28	0,44	16,5	0,5
<b>C3 XL</b>	10	A+lindano	3,65	3,23	6,05	2,28	0,20	0,18	0,23	8,94	67,67	16,70	0,93	18,0	0,2
<b>C3 III</b>	>40	BC	4,55	4,46	1,14	0,06	0,01	0,07	0,03	1,31	87,02	0,73	0,04	18,3	0,3
<b>C4 0</b>			4,95	4,25	3,21	2,80	0,08	0,04	0,07	6,20	51,77	6,60	0,32	20,6	-
<b>C4 I</b>	0-10	Ap1 (relleno)	5,48	4,85	0,4	8,80	0,26	0,17	0,54	10,17	3,93	4,38	0,29	15,1	37,0
<b>C4 II</b>	10,0-20	Ap2 (relleno)	5,63	4,82	0,54	6,80	0,48	0,19	0,15	8,16	6,62	3,73	0,26	14,3	37,0
<b>C4 III</b>	20-36	Ap3 (relleno)	5,87	4,95	0,44	8,40	0,51	0,21	0,10	9,66	4,55	3,48	0,22	15,8	37,0
<b>C4 IV</b>	36-46	Ap4 (relleno)	5,94	5,21	0,12	10,00	0,31	0,19	0,09	10,71	1,12	3,28	0,24	13,7	37,0
<b>C4 XL</b>	46-48	2A+lindano	4,34	4,01	3,16	3,80	0,09	0,15	0,07	7,27	43,47	7,19	0,29	24,8	16,8
<b>C4 V</b>	48-57	2A1	4,82	4,31	3,23	0,90	0,03	0,11	0,06	4,33	74,60	5,54	0,25	22,2	16,8
<b>C4 VI</b>	57-67	2A2	4,98	4,41	2,59	0,72	0,03	0,13	0,05	3,52	73,58	4,52	0,20	22,6	16,8-
<b>C4 VII</b>	67-75	2AB	4,93	4,53	1,31	0,18	0,01	0,10	0,06	1,66	78,92	1,57	0,02	78,5	2,5
<b>C4 VIII</b>	75-85	2B1	5,05	4,58	0,47	0,23	0,01	0,11	0,05	0,87	54,02	0,62	0,02	31,0	1,3
<b>C4 IX</b>	85-95	2B2	5,02	4,63	0,25	0,22	0,02	0,10	0,06	0,65	38,46	0,32	0,02	16,0	1,3
<b>C5 I</b>	0-52	Ap (relleno)	6,16	5,24	0,12	6,10	0,37	0,04	0,32	6,95	1,73	2,74	0,17	16,1	35,6
<b>C5 II</b>	52-69	2A	7,01	6,43	0,02	22,90	0,16	0,10	0,23	23,41	0,09	7,51	0,41	18,3	7,6
<b>C5 III</b>	69-79	2AB	7,45	6,82	0,02	9,40	0,09	0,15	0,12	9,78	0,20	2,01	0,07	28,7	2,3
<b>C5 IV</b>	>80	2BC	5,19	4,66	0,74	0,25	0,02	0,05	0,02	1,08	68,52	0,91	0,03	30,3	1,6
<b>C6 I</b>	0-30	A (relleno)	5,71	4,98	0,35	2,50	0,62	0,31	0,46	4,24	8,25	3,49	0,18	19,4	7,8
<b>C6 III</b>	30-54	2A-lindano	4,82	4,35	3,88	0,57	0,09	0,09	0,14	4,77	81,34	7,89	0,41	19,2	0,7
<b>C6 IV</b>	54-64	2AB	4,98	4,58	1,38	-	-	0,03	0,04	-	-	1,98	0,06	33,0	0,9
<b>C6 II</b>	>64	2C	5,04	4,1	2,91	0,60	0,16	0,37	0,36	4,40	66,14	0,85	0,03	28,3	1,3
<b>C7 I</b>	0-20	Ap (relleno)	5,41	4,41	1,63	1,83	0,30	0,03	0,27	4,06	40,15	2,13	0,09	23,7	6,8
<b>C7 II</b>	20-35	2A	5,08	4,39	0,27	1,26	0,08	0,09	0,12	1,82	14,84	6,83	0,39	17,5	2,0
<b>C7 III</b>	35-45	2BC	4,85	4,15	1,7	0,07	0,02	0,02	0,06	1,87	90,91	0,41	0,02	20,5	2,5
<b>C8 I</b>	0-15	A	4,99	4,26	3,31	1,11	0,21	0,20	0,28	5,11	64,77	7,11	0,39	18,2	2,3

### *Contenido y distribución de HCH*

La Tabla 1.3 recoge la concentración de cada uno de los isómeros de HCH en las distintas muestras de la parcela PV4, obtenidas tras la extracción en ultrasonidos con mezcla de hexano:acetona (Concha-Graña et al., 2006). Como se ve, en la mayoría de las muestras los isómeros predominantes fueron el  $\alpha$ -HCH y el  $\beta$ -HCH, mientras que los isómeros  $\gamma$ -HCH y, sobre todo,  $\delta$ -HCH estaban a niveles muy inferiores. Asimismo se observó una distribución irregular de los isómeros en los distintos perfiles muestreados y a las distintas profundidades. Los perfiles en los cuales se encontraron los valores más elevados de los isómeros de HCH son C2, C3, C4 y C6. Estos puntos están próximos entre sí, y corresponden a una zona localizada de la parcela objeto de estudio (Figura 1.2). Por otro lado, el análisis de las muestras en las cuales se observó a simple vista restos de HCH, identificados como XL, reveló la presencia de valores extraordinariamente altos de los isómeros  $\alpha$ -HCH y  $\beta$ -HCH, aunque en el punto C3-XL también se observaron valores altos de  $\gamma$ -HCH. A pesar de la elevadísima concentración de HCH en estos puntos, la concentración por debajo de ellos es comparativamente baja, lo que pone de manifiesto la relativamente baja movilidad del residuo.

En la Figura 1.6 se representa la concentración de los isómeros mayoritarios junto al contenido de carbono en las calicatas C1 a C5. Podemos observar que, a pesar de esta baja movilidad del HCH dentro del perfil, ésta puede llegar a ser suficiente como para producir una contaminación de los horizontes profundos del suelo, sobre todo en las partes bajas de la parcela. Esta contaminación en profundidad se pone claramente de manifiesto en las muestras del perfil C1, lo que puede derivar de un proceso repetido de drenaje lateral y encharcamiento de la zona. El enriquecimiento en profundidad se produce fundamentalmente a costa del isómero  $\alpha$ -HCH, siendo muy baja la proporción de  $\beta$ -HCH.

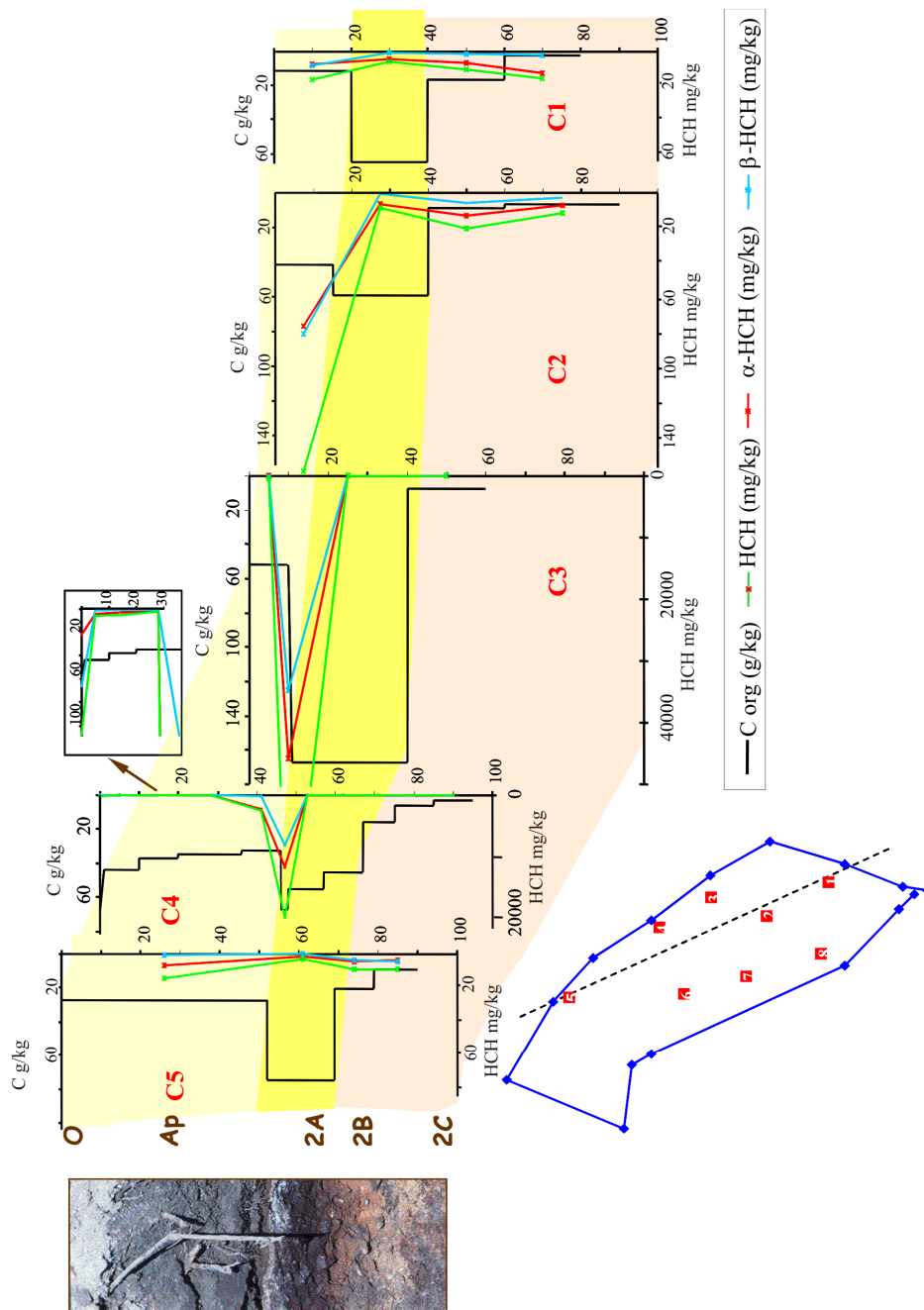
La importancia de la vegetación en el ciclo del contaminante se pone de manifiesto al observar los datos obtenidos para las muestras con restos vegetales (C4, horizonte O). Aquí la concentración de HCH es considerablemente mayor que en el horizonte A subyacente, produciéndose un enriquecimiento entre 4 y más de 100 veces según el isómero. El enriquecimiento relativo es sensiblemente más elevado para el isómero  $\beta$ - que para  $\alpha$ -HCH. El análisis de

HCH en muestras de plantas vivas recogidas en el entorno de la calicata 4 (Barriada-Pereira et al., 2003; Calvelo et al., 2006) confirmó el enriquecimiento proporcionalmente más importante para  $\beta$ - que para  $\alpha$ - HCH en tejidos vegetales. Aunque menor, también se observó enriquecimiento de  $\delta$ -HCH.

**Tabla 1.3:**

Concentración de HCH en las muestras de la parcela PV4. Determinada por el Departamento de Química Analítica da Universidade da Coruña.

Muestra	Profundidad (cm)	$\alpha$ -HCH (mg kg <sup>-1</sup> )	$\gamma$ -HCH (mg kg <sup>-1</sup> )	$\beta$ -HCH (mg kg <sup>-1</sup> )	$\delta$ -HCH (mg kg <sup>-1</sup> )	$\Sigma$ -HCH (mg kg <sup>-1</sup> )
C1 I	0-20 (variable)	7.71	0.39	8.20	0.20	16.5
C1 II	20-40 (variable)	4.48	0.41	0.83	0.45	6.17
C1 III	40-60 (variable)	6.71	1.85	1.36	0.48	10.4
C1 IV	>60	12.3	1.23	1.96	0.39	15.9
C2 I	0-15	76.7	1.95	81.4	1.35	161
C2 II	15-40	7.03	0.50	0.85	0.14	8.52
C2 III	40-60	13.0	1.23	5.79	0.55	20.6
C2 IV	>60	7.15	0.71	3.18	0.47	11.5
C3 I	0-10	67.9	2.56	280	2.49	353
C3 XL	10	45814	<47,6	34830	343	80987
C3 II	10-40 (discontinuo)	28.3	2.98	21.5	3.77	56.5
C3 III	>40	56.0	2.73	5.48	1.10	65.3
C4 0	0	22.4	6.52	66.2	13.0	108
C4 I	0-10	4.31	0.35	1.28	0.18	6.12
C4 II	10-20	3.09	0.50	0.95	0.42	4.96
C4 III	20-36	1.92	<0.07	0.49	<0.08	2.41
C4 IV	36-46	2377	<47,6	187	17.1	2582
C4 XL	46-48	11760	<47,6	8251	<53,2	20011
C4 V	48-57	17.5	3.93	29.6	7.34	58.3
C4 VI	57-67	9.65	4.08	14.1	4.96	32.6
C4 VII	67-75	9.61	1.30	20.0	1.22	32.1
C4 VIII	75-85	3.45	0.20	1.85	<0.08	5.50
C4 IX	85-95	2.09	<0.07	0.56	<0.08	2.65
C5 I	0-52	6.60	5.77	0.85	1.09	14.3
C5 II	52-69	1.84	0.36	0.37	0.22	2.79
C5 III	69-79	4.44	0.44	3.48	0.49	8.85
C5 IV	>80	3.42	0.46	4.54	0.58	9.00
C6 I	0-30	9.41	0.58	18.2	0.46	28.7
C6 III	30-54	69.9	4.87	50.8	4.60	130
C6 IV	54-64	6.80	0.45	4.34	0.30	11.9
C6 II	>64	50.8	5.35	14.9	1.44	72.4
C7 I	0-20	1.39	0.79	2.13	0.30	4.61
C7 II	20-35	8.95	1.80	27.5	0.67	38.9
C7 III	35-45	4.51	0.40	26.5	1.17	32.6
C8 I	0-20	4.77	0.53	18.7	0.30	24.3

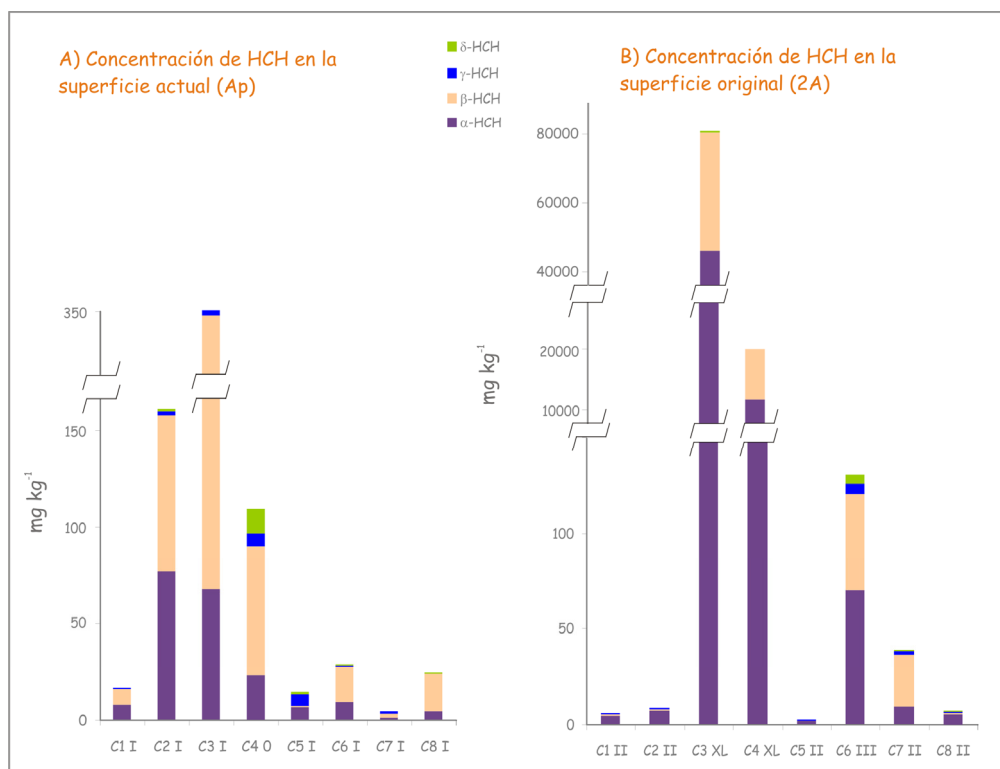


**Figura 1.6:** Distribución vertical del carbono orgánico y de los principales isómeros de HCH en las calicatas C1 a C5 de la parcela PV4.

En la Figura 1.7A se representa un diagrama acumulativo de los niveles de los isómeros de HCH obtenidos en los puntos recogidos en la superficie actual de la parcela. Como puede observarse, en todos los puntos se han obtenido valores superiores al de intervención ( $2 \text{ mg kg}^{-1}$  de suelo seco (DOGA, 1999)). Los puntos más contaminados en la superficie son el C2, C3 y C4 y se encuentran en una región muy localizada de la parcela, que ya había sido identificada visualmente en el momento de la toma de muestras (Figura 1.3). El punto C3 es el que presenta los valores más elevados de contaminación, especialmente para el isómero  $\beta$ -HCH aunque también son muy elevados para  $\alpha$ -HCH. Los valores encontrados fueron similares a los obtenidos en el punto C2, aunque en esta muestra la concentración de  $\beta$ -HCH fue considerablemente menor ( $81,4 \text{ mg kg}^{-1}$  frente a los  $280 \text{ mg kg}^{-1}$  del punto C3). El punto C4 también merece una mención especial siendo uno de los puntos en los cuales los niveles de  $\gamma$ -HCH y  $\delta$ -HCH son más elevados, lo mismo ocurre para el punto C5 aunque aquí los niveles de  $\delta$ -HCH ya son inferiores. En general, en todos los puntos, excepto en el C5, el isómero predominante en superficie es el  $\beta$ -HCH.

Cuando se representan los valores de lo que se cree que era la “superficie original” de la parcela, anterior a las distintas etapas de relleno que se han realizado en la misma, los resultados obtenidos son sustancialmente distintos (Figura 1.7B). Los puntos C4 y muy especialmente el punto C3 son los más contaminados, aunque también se encuentran valores importantes de todos los isómeros en los puntos C6 y C7. En la mayoría de los puntos el isómero predominante es el  $\alpha$ -HCH, a diferencia de lo que ocurría en la superficie actual. En el punto C6 se han encontrado valores muy superiores a los obtenidos en los otros puntos para los isómeros  $\gamma$ -HCH y  $\delta$ -HCH.





**Figura 1.7:** Concentración de HCH en las superficies A) actual (Ap) y B) original (2A) de la parcela PV4.

## Estudio de detalle del HCH “total” y “biodisponible”

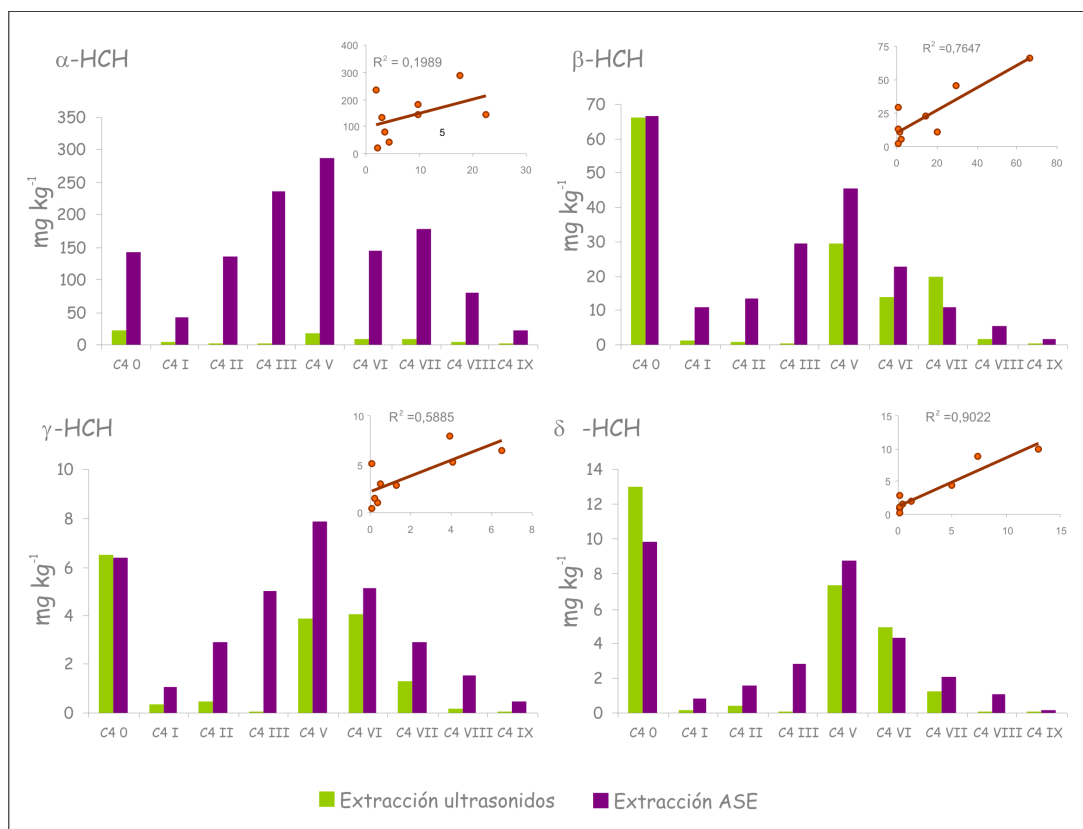
### Contenido total de HCH

En la Figura 1.8 se muestran las concentraciones de  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH obtenidas mediante extracciones con ultrasonidos y extracción con ASE y las correlaciones entre los dos métodos. De forma general, se han obtenido concentraciones superiores de todos los isómeros con la extracción con ASE que con ultrasonidos. Las diferencias son especialmente acusadas para el isómero  $\alpha$ -HCH, para el que el método ASE dio concentraciones del orden de 10 veces mayores que el método ultrasonidos; para este isómero la correlación entre los dos métodos no era significativa ( $r = 0,46$ ). Las diferencias entre los dos métodos son mucho menos acusadas para los otros tres isómeros y las

correlaciones mucho mejores, especialmente para  $\delta$ -HCH ( $r = 0,95, 0,87$  y  $0,77$  para  $\delta$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -HCH, respectivamente).

Esta discordancia de los resultados podría ser debida, en parte, a la heterogeneidad de la muestra, puesto que en la parcela se encontraron isómeros de HCH de forma muy heterogénea, lo que dificulta la perfecta homogenización de la muestra. Sin embargo, lo más probable es que estos resultados reflejen la superioridad de extracción del método de ASE, puesto que es un método mucho más vigoroso que la sonicación. La técnica de extracción con líquidos presurizados (ASE, Accelerated Solvent Extraction) permite hacer la extracción de los contaminantes con disolventes convencionales a elevada presión y temperatura, por lo tanto, se aumenta mucho la solubilidad del analito, incluso por encima del punto de ebullición del disolvente (Li et al., 2003).

De acuerdo con estos resultados, otros autores también han encontrado una mayor extractabilidad de distintos contaminantes en suelos utilizando el método ASE en comparación con la extracción en ultrasonidos. Concha-Graña (2004) obtuvo porcentajes de extracción con ASE generalmente superiores que en ultrasonidos para distintos pesticidas organoclorados. Entre ellos, para el isómero  $\beta$ -HCH la recuperación con ultrasonidos era del orden del 75% de la recuperación con ASE. Li et al. (2003) encontraron que la técnica ASE permitía recuperaciones de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) y fenoles en suelos superiores al ultrasonidos. La diferencia era especialmente marcada para fenol y cresol, compuestos para los que, con ultrasonidos, se extraía menos del 50% de la cantidad extraída con ASE.



**Figura 1.7:**

Concentraciones de HCH en el perfil C4 obtenidas tras la extracción con hexano:acetona usando ultrasonidos y usando un ASE 200 y correlación obtenida entre ambas extracciones.

### *Fracción biodisponible de HCH*

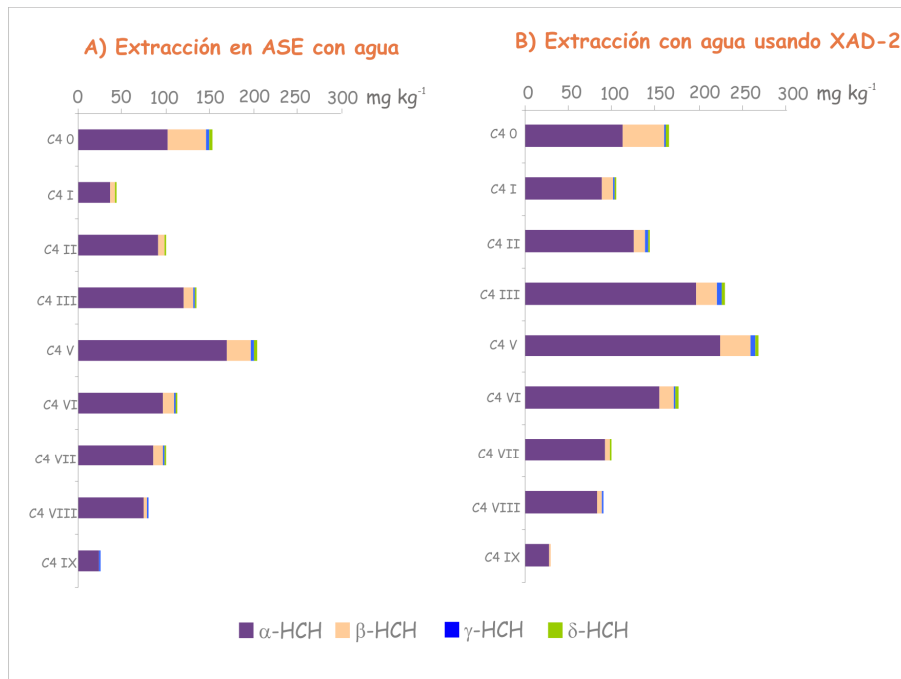
La extractabilidad de un compuesto puede ser operacionalmente definida por la naturaleza de los extractantes usados y las condiciones experimentales bajo las que se realiza la extracción (Tao et al., 2004); por ello, para estudiar la biodisponibilidad de los isómeros de HCH se realizaron dos extracciones diferentes con agua y comparamos los resultados obtenidos con cada uno de ellos.

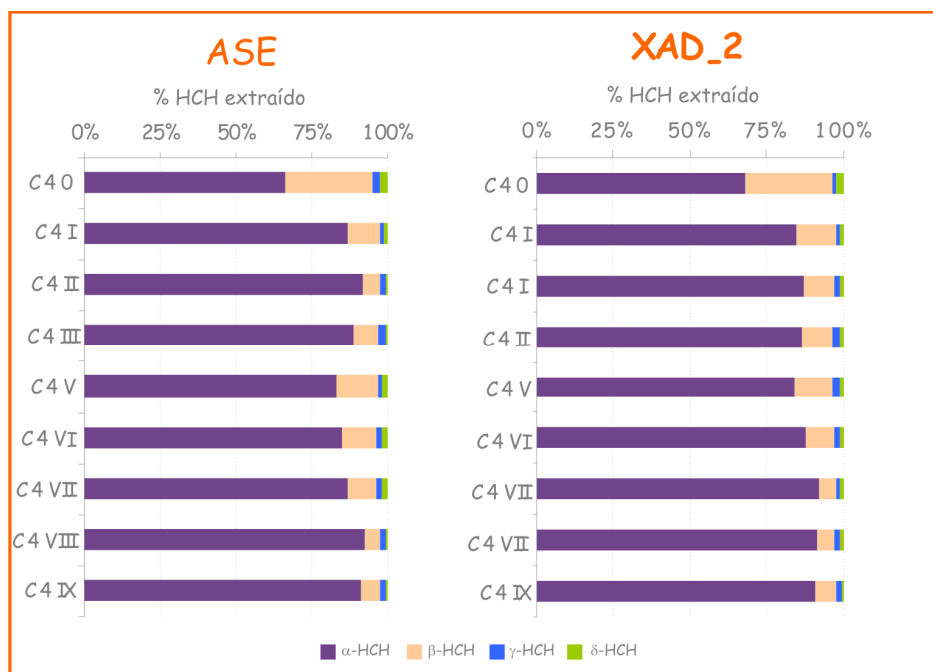
En la Figura 1.9 se muestra la cantidad de HCH extraída con agua de cada una de las muestras usando ASE (Figura 1.9A) y XAD-2 (Figura 1.9B). Vemos

que el isómero mayoritario en el extracto acuoso es el alfa, seguido de beta, probablemente debido a su mayor concentración en estas muestras. En mucha menor concentración aparecen  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH.

Los resultados obtenidos con ambos ensayos de biodisponibilidad son del mismo orden, aunque en general, las concentraciones extraídas de los isómeros de HCH usando la resina XAD-2 son ligeramente mayores que usando ASE. El porcentaje de cada uno de los isómeros presente en el extracto acuoso usando ASE o XAD-2 es prácticamente el mismo (Figura 1.10), lo que no indica que ambos métodos nos dan resultados análogos. Al mismo tiempo la proporción de isómeros en el extracto acuoso es del mismo orden que en el residuo sólido.

**Figura 1.9:**  
Concentración  
de isómeros de  
HCH obtenida  
tras la extracción  
con agua en un  
ASE 200 y con  
XAD-2.





**Figura 1.10:** Porcentaje de cada uno de los isómeros de HCH extraídos en agua usando ASE y XAD-2.

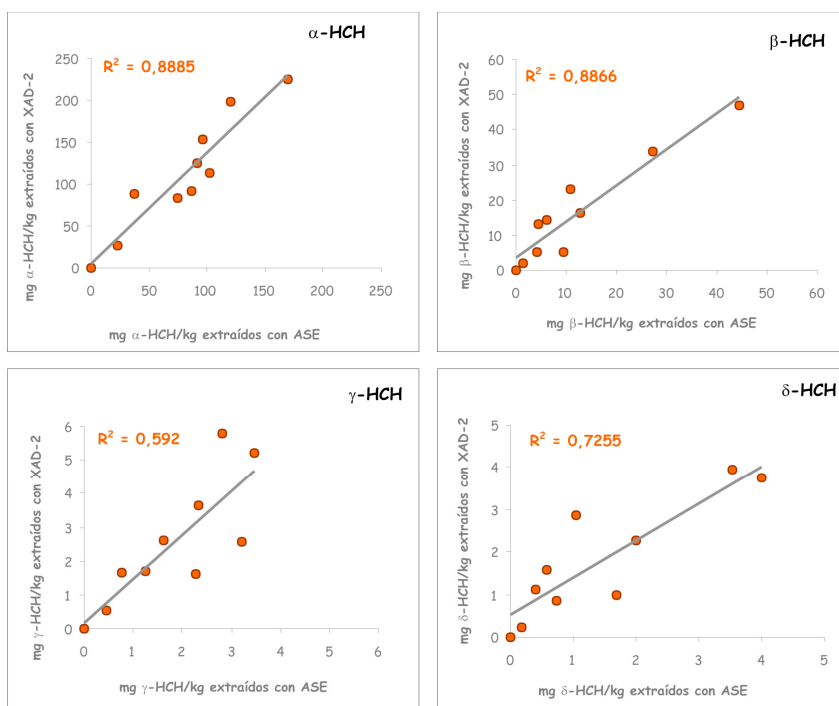
La correlación entre las extracciones obtenidas por los dos métodos es significativa, siendo especialmente elevada para los isómeros alfa y beta, para los que se han obtenido coeficientes de correlación ( $r$ ) de 0,92 y 0,94 respectivamente. Para el isómero delta el coeficiente de correlación obtenido es de 0,85, y solo de 0,77 para el isómero gamma (Figura 1.11).

En general en los estudios de extracción con fases acuosas se encuentra una buena relación entre la extractabilidad y la biodegradabilidad (Reid et al., 2000). Existen diversos estudios que reflejan que la partición de compuestos entre suelo y disolución acuosa refleja la cantidad de compuesto que es disponible a microorganismos.

Los métodos de extracción usados para determinar la fracción “biodisponible” en este estudio no están limitados por la solubilidad en agua del HCH y son una buena alternativa a los métodos convencionales de extracción con agitación suelo-agua. Estos últimos no son adecuados debido a la baja solubilidad de los contaminantes orgánicos; la agitación simple con agua no

puede transferir todo el compuesto intercambiable (Reid et al., 2000), es decir, la disolución del compuesto está limitada por su baja solubilidad y por tanto se está subestimando su biodisponibilidad. La extracción simple con agua puede ser el reflejo de la composición de la disolución del suelo y, por tanto, estimar la “biodisponibilidad actual”, mientras que los métodos en los que se usa ASE y XAD-2 reflejan la cantidad acumulada que se puede transferir a la disolución del suelo, y por tanto, estimarían la fracción “potencialmente biodisponible”.

**Figura 1.11:**  
Relación entre los  
resultados de  
biodisponibilidad  
obtenidos con ASE  
y con la resina  
XAD-2.



### Conclusiones

1. La composición del residuo presente en los suelos contaminados del polígono de Torneiros confirma que su procedencia es de la fabricación de lindano, puesto que el principal componente del residuo es el isómero alfa, seguido de isómero beta, y con un bajo contenido de gamma-HCH.
2. La lixiviación de este residuo pone de manifiesto las diferentes solubilidades de los isómeros, resultando el isómero delta, minoritario en el residuo, el mayoritario en los lixiviados.
3. El estudio de la ecotoxicidad de los lixiviados del residuo bruto nos indica que existe una correlación entre la concentración de HCH y el porcentaje de inhibición de las bacterias estudiadas, por tanto, podemos decir que la mezcla de HCH utilizada tiene efectos ecotóxicos.
4. El estudio de la parcela experimental indica una distribución heterogénea del contaminante en superficie y en profundidad, siendo máxima en la superficie del horizonte A cubierto por aportes antropogénicos y otros artefactos. Aunque el movimiento del HCH dentro del perfil es limitado puede llegar a ser suficiente como para provocar la contaminación de los horizontes profundos naturales.
5. La vegetación tiene un efecto acumulativo de los isómeros de HCH, produciéndose un enriquecimiento, sobre todo en isómero beta, en los horizontes superficiales con restos vegetales.
6. La extracción con agua utilizando la técnica de extracción con líquidos presurizados (ASE) es comparable a la conseguida con el uso de la resina XAD-2 y podría ser un buen estimador de la fracción potencialmente biodisponible de HCH en el suelo.

## Referencias

- Abhilash, P.C., S. Jamil, V. Singh, A. Singh, N. Singh and S.C. Srivastava. 2008. Occurrence and distribution of hexachlorocyclohexane isomers in vegetation samples from a contaminated area. *Chemosphere* 72:79-86.
- Alexander, M. 2000. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 34:4259-4265.
- Barriada-Pereira, M., E. Concha-Grana, M.J. Gonzalez-Castro, S. Muniategui-Lorenzo, P. Lopez-Mahia, D. Prada-Rodriguez and E. Fernandez-Fernandez. 2003. Microwave-assisted extraction versus soxhlet extraction in the analysis of 21 organochlorine pesticides in plants. *J. Chromatogr. A* 1008:115-122.
- Calvelo Pereira, R., M. Camps-Arbestain, B. Rodriguez Garrido, F. Macias and C. Monterroso. 2006. Behaviour of alpha -, beta -, gamma -, and delta - hexachlorocyclohexane in the soil-plant system of a contaminated site. *Environ. Pollut.* 144:210-217.
- Concha-Graña, E. 2004. Desarrollo de métodos de análisis de pesticidas organoclorados en matrices ambientales. Tesis Doctoral. Departamento de Química Analítica, Universidade da Coruña, A Coruña.
- Concha-Grana, E., M.I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo, P. Lopez-Mahia, D. Prada-Rodriguez and E. Fernandez-Fernandez. 2006. Evaluation of HCH isomers and metabolites in soils, leachates, river water and sediments of a highly contaminated area. *Chemosphere*. 64:588-595.
- DOGA (Diario Oficial de Galicia). 1999. Decreto 263/1999, de 30 de septiembre, por el que se fija la concentración límite en suelos afectados por vertidos de residuos de HCH.
- Eptisa, 1999. Investigación de los suelos contaminados en el emplazamiento de Torneiros -Concello de O Porriño- (Pontevedra). Informe técnico.



- Gan, J., S.K. Papiernik, W.C. Koskinen and S.R. Yates. 1999. Evaluation of accelerated solvent extraction (ASE) for analysis of pesticide residues in soil. *Environ. Sci. Technol.* 33:3249-3253.
- IUSS Working Group WRB. 2007. World Reference Base for Soil Resources 2006, first update 2007. World Soil Resources Reports No. 103. FAO, Rome.
- Kanazawa, J. 1989. Relationship between the soil sorption constants for pesticides and their physicochemical properties. *Environ. Toxicol. Chem.* 8:477-484.
- Li, K., M. Landriault, M. Fingas and M. Llompart. 2003. Accelerated solvent extraction (ASE) of environmental organic compounds in soils using a modified supercritical fluid extractor. *J. Hazard. Mater.* 102:93-104.
- Li, Y.F., T.F. Bidleman, L.A. Barrie and L.L. McConnell. 1998. Global hexachlorocyclohexane use trends and their impact on the arctic atmospheric environment. *Geophys. Res. Lett.* 25:39-41.
- Northcott, G.L. and K.C. Jones. 2001. Partitioning, extractability, and formation of nonextractable PAH residues in soil. 2. effects on compound dissolution behavior. *Environ. Sci. Technol.* 35:1111-1117.
- Olsen, S.R., and L.E. Sommers. 1982. Phosphorus. p. 403-430. In A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney (eds.) *Methods of soil analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. 2nd ed. Agron. Monogr. 9. ASA and SSSA, Madison, WI.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 1991. Environmental Program on hemical Safety. Environmental Health Criteria 124, Lindane. Geneva, Switzerland.
- Pignatello, J.J. and B. Xing. 1996. Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. *Environ. Sci. Technol.* 30:1-11.

- Ramos Prieto, M.R. 1996. Determinación de biotoxicidad en aguas residuales. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Reid, B.J., K.C. Jones and K.T. Semple. 2000. Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments-a perspective on mechanisms, consequences and assessment. *Environ. Pollut.* 108:103-112.
- Semple, K.T., A.W.J. Morriss and G.I. Paton. 2003. Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: Fundamental concepts and techniques for analysis. *European Journal of Soil Science* 54:809-818.
- Tao, S., L.Q. Guo, X.J. Wang, W.X. Liu, T.Z. Ju, R. Dawson, J. Cao, F.L. Xu and B.G. Li. 2004. Use of sequential ASE extraction to evaluate the bioavailability of DDT and its metabolites to wheat roots in soils with various organic carbon contents. *Sci. Total Environ.* 320:1-9.
- Walker, K., D.A. Vallero and R.G. Lewis. 1999. Factors influencing the distribution of lindane and other hexachlorocyclohexanes in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 33:4373-4378.
- Willett, K.L., E.M. Ulrich and R.A. Hites. 1998. Differential toxicity and environmental fates of hexachlorocyclohexane isomers. *Environ. Sci. Technol.* 32:2197-2207.



## Capítulo 2

*Retención de los isómeros*

*$\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH en*

*suelos y distintos*

*componentes del suelo*

Publicado en:

B. Rodríguez-Garrido, C. Monterroso, M. Camps Arbestain and F. Macías. 2003. **Sorption of hexachlorocyclohexane isomers on soils which differ in the type of organic matter and clay fraction.** (Poster). International workshop on bioavailability of soil pollutants and risk assessment, Monteverita, Ticino, Suiza.

B. Rodríguez-Garrido, F. Macías and M.C. Monterroso. 2005. **Retention of hexachlorocyclohexane residues derived from lindane synthesis by natural soils and soil colloidal components.** (Poster). COST Action 859. 1st Scientific Workshop and Management Committee Meeting, Pisa-Italia.

## Resumen

Los procesos de retención en el suelo determinan, en gran medida, la movilidad y biodisponibilidad de los contaminantes orgánicos, siendo los coloides del suelo, los factores clave en el control de la sorción.

En este estudio se evaluó la capacidad de retención de HCH en tres suelos con propiedades marcadamente diferentes (dos de ellos con y sin eliminación de la materia orgánica (MO) con  $H_2O_2$ ), y en distintos componentes del suelo (dos minerales de arcilla, montmorillonita y caolinita; un óxido de hierro, goetita; arena de cuarzo y un ácido húmico comercial). Se realizaron experimentos “batch”, en condiciones abióticas, mediante adiciones sucesivas de disoluciones acuosas contaminadas con los isómeros  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ - HCH, en niveles de concentración próximos a sus solubilidades en agua.

En general, las isotermas obtenidas mediante la representación de la concentración retenida frente a la concentración de equilibrio en disolución mostraron mejores ajustes para el modelo de Freundlich que para el modelo lineal y de Langmuir.

Los diferentes isómeros de HCH mostraron comportamientos similares para un mismo sorbente, aumentando la cantidad de isómero retenido al aumentar la cantidad de isómero añadido; sin embargo, había grandes diferencias ente los distintos sorbentes.

El orden decreciente de afinidad mostrado por los diferentes sorbentes por el HCH fue: ácido húmico >> caolinita  $\approx$  montmorillonita > A-A > A-P > B-F > A-A sin MO > goetita > A-P sin MO > arena. La retención de HCH en ácido húmico fue de 10 g de HCH por kg de sorbente, aproximadamente 10 veces mayor que la retención en las arcillas (que presentaron comportamientos casi idénticos), mientras que para las muestras de óxido de hierro, arena y suelos a los que se eliminó la materia orgánica la cantidad retenida no llegó a 0,5 g HCH por kg de sorbente. La materia orgánica resultó ser el principal sorbente de HCH, siendo su naturaleza y cantidad factores decisivos en el aumento de retención.

### Introducción.

El estudio del comportamiento de los **contaminantes orgánicos** en el medio ambiente, especialmente de los más tóxicos y persistentes, es un aspecto clave para el desarrollo de estrategias de prevención de su impacto sobre la salud humana y los recursos naturales. Cuando un contaminante entra en el medio ambiente generalmente no permanece en un lugar específico sino que se mantiene de forma dinámica dentro de un reservorio o a través de reservorios adyacentes. La tendencia de un contaminante para moverse dentro o distribuirse entre diferentes medios (o fases) viene determinada por sus propiedades físicas y químicas y los factores y variables ambientales. La cantidad y forma del contaminante en el medio afecta a su impacto ambiental, y debe ser tomada en cuenta en los estudios de análisis de riesgos para la salud y la protección de los ecosistemas que exige el Real Decreto 9/2005 para la Declaración de Suelo contaminado, de acuerdo con la Ley 10/98 de Residuos. Por tanto es necesario entender los parámetros que gobiernan el movimiento de un medio a otro y la forma y alcance en que el contaminante se asocia a diferentes fases dentro de un sistema local determinado.

El **suelo** constituye un sustrato particularmente favorable al depósito y acumulación de los compuestos persistentes en el medio ambiente. Este proceso se ve afectado por un elevado número de factores, como la topografía del lugar, humedad, radiación solar, regímenes de vientos y lluvias y características biosféricas en general, pero cabe destacar, en primer lugar, las características estructurales y físico-químicas del propio suelo, por un lado, y la estructura y características químicas del compuesto, por otro (Macías, 1999; Macías and Calvo de Anta, 2001; Schwitzguebel et al., 2006; Tejedor Gilmartin et al., 1974). Los coloides son los componentes del suelo que más contribuyen al control del movimiento de los pesticidas a través del medio edáfico y retardan su lixiviado hacia aguas subterráneas.

La **retención** es uno de los procesos clave que afectan al destino de compuestos orgánicos en el sistema suelo-agua. La retención se refiere a la capacidad del suelo de recluir a un pesticida u otro compuesto orgánico e impedir el movimiento de la molécula fuera de la matriz del suelo. Ya que

raramente se conocen con exactitud los procesos involucrados en la retención (fundamentalmente procesos de precipitación y adsorción), se usa el término general “**sorción**” para describir la fijación de estos compuestos orgánicos por el suelo. El término **sorción** se refiere al proceso de retención en general, sin hacer distinción entre adsorción, absorción, precipitación, oclusión en la matriz del suelo (efecto “aging”) o formación de “bound residues” (Koskinen y Harper, 1990).

Los estudios de sorción de contaminantes orgánicos en suelos se iniciaron con el comienzo del uso de pesticidas en los años 40. Estos estudios facilitaron la comprensión de la interacción de los contaminantes con el medio y la persistencia de dichos compuestos. En los años 70 la investigación en este campo alcanzó su punto máximo después de que se descubriera una gran variedad y grandes cantidades de pesticidas en residuos orgánicos industriales vertidos al medio ambiente. A lo largo de los años, las investigaciones en este campo han aportado importantes datos sobre las características de las interacciones contaminante-suelo, tanto con componentes orgánicos como minerales, y sobre las propiedades de los contaminantes orgánicos. El entendimiento de las funciones mecánicas de la materia orgánica y mineral en el suelo y el efecto del agua sobre sus funciones ayudan a hacer predicciones razonables del alcance de la sorción de una amplia variedad de componentes orgánicos bajo diferentes condiciones del sistema (Chiou, 2002).

Weber et al. (1991) resumieron las posibles interacciones entre soluto y sorbente incluyéndolas en 3 categorías definidas en términos de sorción física, química y electrostática. Los procesos de sorción física implican interacciones entre momentos dipolares (permanentes o inducidos) de moléculas de sorbato y sorbente. Las fuerzas de enlace relativamente débiles asociadas a la sorción física suelen amplificarse en el caso de moléculas hidrofóbicas por los importantes gradientes termodinámicos de repulsión hacia el disolvente. Las interacciones químicas implican enlaces covalentes y enlaces de hidrógeno. Por último, las interacciones electrostáticas implican fuerzas ión-ión y fuerzas ión-dipolo. En forma más detallada, los tipos de interacciones son los siguientes: interacciones de van der Waals, enlace hidrofóbico, enlace de hidrógeno, transferencia de carga, intercambio de ligandos y enlace iónico, interacciones



ión-dipolo y dipolo-dipolo y quimisorción (enlace covalente). La sorción de los contaminantes orgánicos a veces puede explicarse con la contribución simultánea de dos o más de estos mecanismos, especialmente cuando el carácter no polar o polar o de los compuestos no está bien definido (Delle Site, 2001).

En general, en los suelos con elevado contenido de materia orgánica la sorción se correlaciona bien con el contenido de carbono orgánico (CO) y, generalmente, se acepta que es el factor principal en el control de la sorción de pesticidas no iónicos, aunque los mecanismos involucrados no están claramente demostrados. Sin embargo, en los suelos con bajo contenido de materia orgánica la contribución de los constituyentes minerales se hace más importante, especialmente el contenido y la mineralogía de la arcilla (Clausen et al., 2004). Se han obtenido correlaciones empíricas entre el coeficiente de sorción de moléculas orgánicas polares y no polares y el contenido de materia orgánica de suelos y sedimentos, esta correlación se conoce como coeficiente de distribución agua/carbono orgánico ( $K_{CO}$ ). El valor de  $K_{CO}$  para una misma molécula orgánica puede variar de un suelo a otro, lo que sugiere que la sorción puede no ser el resultado de una única interacción con la materia orgánica, por lo que debemos tener en cuenta, además, la influencia de los constituyentes minerales y las condiciones físico-químicas. La distribución heterogénea de la materia orgánica en el suelo también puede ser la causa de variaciones del  $K_{CO}$  entre los suelos. Además, no sólo la cantidad y distribución de la materia orgánica, sino también la naturaleza de los constituyentes orgánicos varía. El coeficiente de sorción  $K_{CO}$  no tiene en cuenta las propiedades de la materia orgánica, como el carácter polar o no polar, su estructura y configuración molecular, pero se sabe que estos factores afectan a la sorción de moléculas orgánicas (Benoit et al., 1996).

Los diferentes isómeros del 1,2,3,4,5,6-hexaclorociclohexano (HCH) son compuestos tóxicos que pertenecen al grupo de los contaminantes orgánicos hidrofóbicos (COHs). De los 4 isómeros formados en el proceso de fabricación solo el isómero  $\gamma$ -HCH tiene propiedades insecticidas, aunque durante muchos años se usó como insecticida una mezcla conocida como HCH técnico, que contiene: 55-80%  $\alpha$ -HCH, 5-14%  $\beta$ -HCH, 8-15%  $\gamma$ -HCH y 2-16%  $\delta$ -HCH (Breivik et al., 1999). El estudio de la sorción de estos compuestos en distintos

suelos y coloides del suelo es fundamental para el entendimiento de los diferentes procesos que ocurren en el suelo como la lixiviación y degradación.

En este estudio se realizaron ensayos de sorción con los isómeros  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ - HCH en niveles de concentración próximos a sus solubilidades en agua. Estos estudios se realizaron en diferentes muestras de suelos y coloides del suelo. El principal objetivo es identificar los parámetros que controlan la sorción de estos compuestos orgánicos no iónicos.

## Material y métodos

### Reactivos utilizados

Los isómeros  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\delta$ - HCH (pureza 98,7, 98,1 y 98,6% respectivamente), de Riedel-de-Haën, el isómero  $\gamma$ -HCH (99% de pureza) de Sigma, la acetona (99,5% de pureza) y el hexano (99,0% de pureza) de Fluka, la azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ) (98,0% de pureza) de Prolabo y el cloruro cálcico ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (96,0%) de Probus.

La disolución contaminante se preparó en agua mili-Q a temperatura ambiente y contiene:  $\text{NaN}_3$  0,005 M, que actúa como inhibidor de la actividad biológica, y  $\text{CaCl}_2$  0,005 M, que actúa como floculante. Esta disolución se contaminó a partir de disoluciones concentradas de  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH en metanol para obtener una concentración final de la mezcla de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de  $\alpha$ -HCH, 0,2 mg L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -HCH y 4,0 mg L<sup>-1</sup> de  $\gamma$ -HCH y  $\delta$ -HCH (la concentración de metanol en la disolución acuosa era menor del 0,1% para asegurarnos de que no interfiere en los procesos de retención como co-solvente).

### Sorbentes

Para realizar los ensayos de sorción de los isómeros  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH se seleccionaron 3 muestras de suelo, con características coloidales marcadamente diferentes, recogidas en el entorno de Santiago (Fotos 2.1, 2.2 y 2.3). Una de las

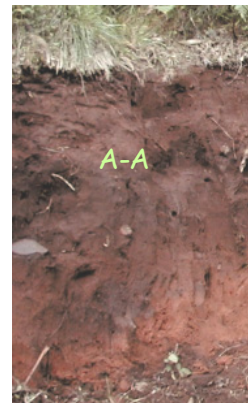
muestras procede del horizonte A de un Andosol úmbrico aluándico (A-A), otra procede del horizonte A de un Podsol háplico (A-P) y la tercera del horizonte Bws de un Ferralsol húmico (B-F). Adicionalmente, se utilizaron 2 muestras de arcilla (montmorillonita y caolinita comerciales), un oxi-hidróxido de hierro (goetita comercial), un ácido húmico comercial, dos de las muestras de suelo (las de mayor carga orgánica) a las que se le eliminó la materia orgánica mediante ataque con peróxido de hidrógeno al 35 % y una de arena de cuarzo comercial (300  $\mu\text{m}$  – 250  $\mu\text{m}$ ).

En la Tabla 2.1 se dan las características más importantes de las tres muestras de suelo.

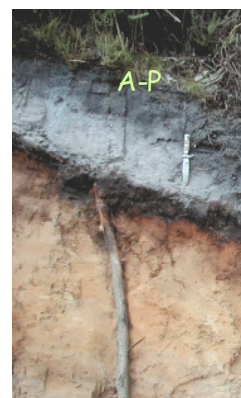
Los tres suelos son de carga variable, presentan bajo pH y baja capacidad de intercambio catiónico (CIC), características típicas de los suelos de Galicia. El **horizonte A de Andosol** es muy oscuro debido al elevado contenido de materia orgánica (9,16% de carbono orgánico). La relación C/N nos indica una buena humificación, mientras que el elevado valor de Al extraído con pirofosfato sódico ( $\text{Al}_p$ ) indica la presencia de complejos organoaluminicos, cuya formación contribuye a la estabilización de esta materia orgánica. Los suelos con carácter ándico presentan una elevada carga variable, elevada adsorción de fosfatos y elevada capacidad de retención de agua (IUSS Working Group, 2007).

El **horizonte A de Podsol** se caracteriza por su fuerte acidez y alto contenido de materia orgánica poco humificada (C/N 21,2), de alta movilidad. Las condiciones de este suelo favorecen la movilización en profundidad de materia orgánica y de Al y Fe en forma complejada, de forma que la cantidad de Fe y Al extraídas en pirofosfato sódico (y otros extractantes) es baja.

El **horizonte B ferrálico** carece prácticamente de materia orgánica, que, además, es muy recalcitrante, pero presenta un elevado contenido en arcilla, principalmente caolinita (Camps Arbestain and Macías, 2000). Los elevados niveles de Fe extraído con ditionito-citrato ( $\text{Fe}_d$ ) reflejan la presencia de elevados contenidos de oxi-



**Foto 2.1:**  
Andosol úmbrico



**Foto 2.2:**  
Podsol háplico



**Foto 2.3:**  
Ferralsol húmico

hidróxidos de Fe cristalinos. Estas características son típicas de un suelo muy alterado, próximo al sistema residual.

La **Montmorillonita** de Aldrich. Es un mineral del grupo de las *esmeectitas*, que presenta estructura 2:1 formada por una capa central octaédrica con  $Mg^{2+}$  y algunas sustituciones por  $Al^{3+}$ , a las que se debe la carga eléctrica, y dos capas tetraédricas en los extremos. Su propiedad más destacable es su capacidad de expansión/retracción interlaminar por el humedecimiento y el secado, lo que se debe a que su estructura posibilita la hidratación de los cationes interlaminares provocando la separación de las láminas. La capacidad de intercambio catiónico de las *esmeectitas* es alta, el valor obtenido para la muestra de este estudio fue de  $62,3 \text{ cmol}(+) \text{ kg}^{-1}$ .

La **Caolinita** procede de Sigma. Es un aluminosilicato, pobre en sílice, con estructura 1:1 formada por una capa tetraédrica unida a una capa octaédrica gipsítica, en la que dos de cada tres huecos octaédricos están ocupados por aluminio. La fórmula estructural es  $Al_2Si_2O_5(OH)_4 \cdot nH_2O$ , con una relación Si/Al igual a la unidad. La caolinita no presenta sustituciones isomórficas significativas, por lo que la estructura es eléctricamente neutra y su capacidad de intercambio catiónico (CIC) es baja, de  $4,8 \text{ cmol}(+) \text{ kg}^{-1}$  en la muestra de este estudio.

La **Goetita** procede de Fluka. Es un oxihidróxido de Fe ( $\alpha\text{-FeOOH}$ ), el más común de los óxidos e hidróxidos presentes en suelos, y está presente en suelos muy meteorizados (Porta Casanellas et al., 1999). La capacidad de intercambio catiónico obtenida fue de  $31,1 \text{ cmol}(+) \text{ kg}^{-1}$ .

El **Acido húmico** procede de Fluka. Es la parte de las sustancias húmicas extraíble con reactivos básicos y precipitable en medio ácido en forma de flóculos de color pardo a negro. Los ácidos húmicos están formados por macromoléculas complejas de unidades aromáticas unidas a aminoácidos, péptidos, aminoazúcares, ácidos alifáticos y otros constituyentes orgánicos. Tienen un carácter más aromático y menos oxidado que los ácidos fúlvicos. El contenido de C de la muestra utilizada fue de  $490,1 \text{ mg kg}^{-1}$  y la capacidad de intercambio catiónico de  $312,5 \text{ cmol}(+) \text{ kg}^{-1}$ .

La **Arena de cuarzo** lavada al ácido procede de Panreac, de estructura  $SiO_2$  y muy estable. Tamaño de partícula 0,25-0,30 mm.

**Tabla 2.1:**

Principales propiedades de los suelos utilizados en los ensayos de sorción de HCH (Barreal Madroño, 2003).

	<b>HORIZONTES</b>		
	<b>A de Andosol</b>	<b>A de Podsol</b>	<b>B de Ferralsol</b>
<b>pH (H<sub>2</sub>O)</b>	4,60	3,97	5,16
<b>pH (KCl)</b>	4,35	2,83	4,11
<b><sup>1</sup>C<sub>org</sub> (g Kg<sup>-1</sup>)</b>	91,6	133,8	3,9
<b>Relación molar C:N</b>	13,68	21,20	10,81
<b>Arcilla (%)</b>	7,5	10,0	31,1
<b>Textura</b>	Franca	Franco arenosa	Franco arenoso limosa
<b><sup>2</sup>CIC (cmol(+) Kg<sup>-1</sup>)</b>	1,7	9,2	2,9
<b><sup>3</sup>Fe<sub>d</sub> (g Kg<sup>-1</sup>)</b>	54,9	2,8	111
<b><sup>4</sup>Al<sub>o</sub> (g Kg<sup>-1</sup>)</b>	24,0	2,1	2,5
<b><sup>5</sup>Al<sub>p</sub> (g Kg<sup>-1</sup>)</b>	11,9	1,7	1,4

<sup>1</sup> C<sub>org</sub> = Carbono orgánico.

<sup>2</sup> CIC = Capacidad de intercambio catiónico.

<sup>3</sup> Fe<sub>d</sub> = Fe extraíble con ditionito-citrato.

<sup>4</sup> Al<sub>o</sub> = Al extraíble con oxalato amónico.

<sup>5</sup> Al<sub>p</sub> = Al extraíble con pirofosfato de Na.

## Ensayo de solubilidad

Debido a la gran variabilidad de los datos de solubilidad de los distintos isómeros de HCH encontrados en diferentes referencias bibliográficas, hemos realizado un ensayo previo para calcular las solubilidades de los isómeros  $\alpha$ -,  $\beta$ -  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH en agua, puesto que es un dato muy importante a tener en cuenta en

los procesos de sorción. Para ello se realizaron por triplicado ensayos individuales de cada isómero a temperatura ambiente. Se pesaron 0,5 mg de cada uno de los isómeros en un matraz erlenmeyer de 100 ml, que previamente fueron lavados con metanol para minimizar los procesos de adsorción sobre el vidrio y se añadieron 50 ml de agua ultrapura. La mezcla se dejó en un agitador magnético durante 5 días, al cabo de este tiempo se centrifugó una alícuota de la disolución a 3000 rpm durante 20 minutos y se pasó la muestra por un filtro de fibra de vidrio. Se pipeteó un volumen de disolución y se realizó una extracción con hexano en ultrasonidos durante 20 minutos. La fase orgánica se secó con sulfato sódico anhidro y se guardó en nevera para su posterior análisis cromatográfico.

### Experimentos de sorción

Los ensayos de sorción se realizaron en sistema “batch” utilizando el método de las “adiciones repetidas” propuesto por Bowman (1979). Este método consiste en dejar en agitación una suspensión de suelo con disolución del contaminante y una vez alcanzado el equilibrio reemplazar un volumen determinado de sobrenadante por un volumen igual de disolución inicial. Generalmente, la concentración de compuesto utilizada es cercana al límite de solubilidad. Este es un método alternativo al estándar, que utiliza disoluciones con concentraciones crecientes de soluto, ya que está limitado por la afinidad del sorbente por el compuesto, la solubilidad en agua del compuesto y la relación sorbente/disolución. Cuando el sorbente tiene una elevada afinidad por el sorbato (>95% de sorción) o cuando el sorbato tiene una baja solubilidad en agua, como el HCH, resulta muy difícil obtener los datos necesarios para generar una isoterma de sorción. El método propuesto por Bowman (1979) pretende extender la isoterma a valores de concentración cercanos y superiores al límite de solubilidad del compuesto estudiado.

Se realizaron ensayos en serie de cada uno de los sorbentes a los que se añadió 25 ml de disolución ( $\text{CaCl}_2$  5mM y  $\text{NaN}_3$  5mM) contaminada con la mezcla de los isómeros  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH ( $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\alpha$ -HCH,  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\beta$ -HCH,  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\gamma$ -HCH y  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\delta$ -HCH). La cantidad de sorbente utilizado varió según su capacidad de retención, para las muestras de suelo (con

y sin MO) y arena se usó 1 gramo de muestra, para las arcillas y la goetita se usaron 0,3 gramos y para el ácido húmico 0,1 gramos. Las suspensiones se agitaron durante 24 horas; después de haber comprobado mediante la realización de un ensayo previo de cinética de sorción que este periodo era suficiente para alcanzar el equilibrio. Después se centrifugó la muestra a 3000 r.p.m durante 20 minutos y se pipetearon 20 ml de la disolución sobrenadante para el análisis de los isómeros de HCH. Posteriormente, se añadieron otros 20 ml de disolución de reacción contaminada con los isómeros de HCH sobre el sorbente que ha quedado en el tubo de centrifuga. Este paso se repitió hasta que la concentración de HCH en disolución permanecía prácticamente constante. Los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente y se realizaron por triplicado en tubos de vidrio Pirex de 30 ml con tapones de plástico fenólico y juntas de PTFE.

### Determinación analítica de HCH

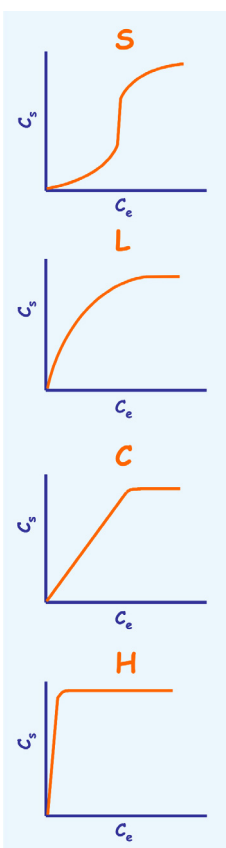
Para el análisis de HCH en las distintas disoluciones se hizo una extracción líquido-líquido de la muestra con hexano durante 20 minutos en un baño de ultrasonidos, y luego se secó con sulfato sódico anhidro.

En el extracto seco se identificaron y cuantificaron los isómeros  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH utilizando un cromatógrafo de gases (modelo GC 8532 Mega 2 series, Fisons Instruments, Milano, Italia), equipado con un inyector de split/splitless, un muestreador automático (modelo AS 800, Fisons Instruments, Milano, Italia) y un detector de captura electrónica (modelo ECD 850, Thermo Quest, Milano, Italia). Para la separación usamos una columna capilar Rtx®-CIPesticides (Restek Corporation, E.E.U.U. Bellefonte, PA) de 30 m de longitud  $\times$  0,25 mm de diámetro interno. Las condiciones de trabajo fueron: inyección de 1  $\mu$ l en modo splitless, temperatura del inyector de 270 °C, temperatura del detector de 300°C, gas portador helio (presión 115 KPa), gas auxiliar del detector N<sub>2</sub> (presión 105 KPa) y gradiente de temperatura. El programa de temperatura utilizado fue: 60 °C (3 min) con una rampa de temperatura de 30 °C min<sup>-1</sup>, hasta 180 °C (0 min), luego hasta 230 °C (0 min) con una rampa de 6 °C min<sup>-1</sup> y finalmente con una rampa de 30 °C min<sup>-1</sup>, hasta 270 °C (4 min).

## Análisis de datos

La cantidad de isómero retenida en cada punto se estimó como la diferencia entre la cantidad añadida y la concentración en la disolución de equilibrio ( $C_e$ ). La cantidad de compuesto  $C_s$  es la cantidad retenida en ese punto más la cantidad que ya estaba retenida en el suelo.

Para describir los fenómenos de sorción generalmente se usan las isotermas, que son representaciones de la cantidad de componente retenido frente a la cantidad que permanece en disolución una vez alcanzado el equilibrio (Carmo et al., 2000). En función de su forma las isotermas de sorción pueden clasificarse en cuatro grupos (Figura 2.1) (Giles et al., 1960):



**Figura 2.1:**  
Tipos de isotermas de sorción (S, L, C y H)

- Las **isotermas de tipo S** son típicas de sorbentes con alta afinidad por el solvente. El tramo inicial de la curva indica que la sorción del soluto se ve favorecida con su aumento de concentración. Estas isotermas indican: (1) interacción específica entre soluto y sorbente, (2) atracción intramolecular moderada y (3) competencia entre el soluto, el solvente y las moléculas adsorbidas por sitios específicos de sorción.
- Las **isotermas tipo L** son las más conocidas y muchas veces se les llama isoterma normal o de Langmuir. Representan una alta afinidad relativa entre el soluto y el sorbente en la fase inicial de la curva, a medida que los sitios específicos de sorción se van ocupando le es más difícil al soluto encontrar un lugar libre para sorberse. Estas isotermas indican (1) múltiples interacciones entre el soluto y el sorbente, (2) fuerte atracción molecular entre las moléculas de soluto y (3) poca competencia entre el soluto y el solvente por los sitios de sorción.
- Las **isotermas tipo C** se caracterizan por un reparto constante del soluto entre la solución y el sorbente, hasta que todos los sitios de sorción están ocupados.
- Las **isotermas tipo H** son muy poco comunes, representan un caso especial de isotermas tipo L. Se observa cuando hay una extrema afinidad entre soluto y sorbente, a bajas



concentraciones de soluto, todo, o prácticamente todo, queda retenido en el sorbente

Para la descripción cuantitativa de los procesos de sorción, las isothermas obtenidas experimentalmente suelen ajustarse a diferentes ecuaciones matemáticas o modelos de sorción, las más usadas son las ecuaciones de Langmuir y Freundlich.

La **ecuación de Langmuir** es un modelo de sorción teórico. Fue desarrollada para describir la adsorción de gases sobre sólidos homogéneos y asume las siguientes afirmaciones (Filep, 1999):

- La superficie del adsorbente posee un número fijo de posiciones de adsorción.
- Cada sitio puede ser ocupado por una sola molécula (adsorción en monocapa).
- La energía de adsorción es idéntica para todas las posiciones de la superficie del sorbente.
- Las moléculas retenidas no interaccionan entre ellas.

La ecuación de Langmuir puede expresarse de la siguiente forma:

$$C_s = \frac{Q_{\max} K_L C_g}{1 + K_L C_g}$$

donde  $C_s$  es la cantidad total adsorbida (adsorbato por unidad de masa de adsorbente),  $Q_{\max}$  es la cantidad máxima que puede ser adsorbida por la monocapa (capacidad de adsorción),  $C_g$  es la concentración en la fase gas y  $K_L$  es la constante de sorción de Langmuir.

La ecuación de Langmuir ajusta los datos cuando la isoterma es de tipo L (Delle Site, 2001).

Aunque la ecuación de Langmuir originalmente deriva de la descripción de la sorción de gases en algunos casos también puede aplicarse a la sorción en sólidos de un compuesto en disolución acuosa (Delle Site, 2001), pero generalmente no es aplicable a suelos por la heterogeneidad de estos. Los datos

obtenidos en el presente trabajo se ajustaron a la ecuación mediante una regresión no lineal, que implica la minimización de la suma de los residuales al cuadrado, que se llama mínimos cuadrados no lineales (conocida por sus siglas en inglés NLLS).

La **ecuación de Freundlich** es un modelo de sorción empírico, es el más antiguo de los modelos no lineales e implica heterogeneidad en las posiciones de sorción. La ecuación de Freundlich es la más usada para describir los procesos de sorción de compuestos orgánicos hidrofóbicos (COHs) puesto que representa bastante bien muchos resultados experimentales y no impone unos límites a la sorción (Chester et al, 1989). La ecuación de Freundlich puede escribirse (Delle Site, 2001):

$$C_s = K_f C_e^{1/n}$$

donde  $C_s$  es la cantidad de compuesto retenido por unidad de masa de sorbente;  $K_f$  es el coeficiente de Freundlich, que nos indica la capacidad de sorción del sorbente;  $C_e$  es la concentración del compuesto en la disolución de equilibrio y  $1/n$  es el parámetro de heterogeneidad y indica cuanto se desvía la isoterma de la linealidad, es un parámetro adimensional (Clausen et al., 2004). Los datos obtenidos en el presente trabajo se ajustaron a la ecuación de Freundlich sin linealizarla, haciendo el ajuste a una ecuación potencial.

La variación de la forma de la isoterma de Freundlich según el valor de  $1/n$  es la siguiente (Delle Site, 2001):

- cuando  $1/n = 1$  la isoterma es de tipo C
- cuando  $1/n < 1$  la isoterma es de tipo L
- cuando  $1/n > 1$  la isoterma es de tipo S

Cuando  $1/n = 1$ , la isoterma se convierte en una relación lineal y  $K_f$  se hace igual al coeficiente de distribución o coeficiente de sorción  $K_d$ . El coeficiente de distribución  $K_d$  describe una relación lineal entre  $C_s$  y  $C_e$ . El **modelo de sorción lineal** describe bien sistemas a baja concentración, asume que la cantidad de un soluto adsorbido es directamente proporcional a la

concentración en disolución. Los datos también fueron analizados asumiendo la isoterma de sorción lineal:

$$K_d = C_s C_e^{-1}$$

donde  $K_d$  es el coeficiente de distribución.

Debido a la importancia que tiene la materia orgánica en la sorción de muchos plaguicidas, fundamentalmente los poco solubles en agua (Chiou, 1989), se suele expresar el coeficiente de distribución  $K_d$  en función del contenido de carbono orgánico (CO) del suelo a través de la ecuación:

$$K_{co} = \frac{K_d \times 100}{\% \text{ CO}}$$

## **Resultados y discusión**

### **Solubilidad del HCH**

En la Tabla 2.2 se muestran las solubilidades experimentales de  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH obtenidas en el laboratorio después de realizar un ensayo a temperatura ambiente con agua saturada de cada uno de los isómeros de HCH por separado. Además, se muestran diferentes datos de solubilidad de HCH dados por diferentes autores. Aunque el orden de magnitud de las solubilidades es el mismo en las diferentes fuentes, se observan diferencias importantes.

Los resultados experimentales mostraron que el isómero  $\delta$ -HCH es el más soluble en agua ( $5,6 \text{ mg L}^{-1}$ ), seguido de  $\gamma$ -HCH ( $4,9 \text{ mg L}^{-1}$ ) y  $\alpha$ -HCH ( $2,4 \text{ mg L}^{-1}$ ), mientras que el isómero  $\beta$ -HCH es el menos soluble de los cuatro, con una solubilidad en agua de un orden de magnitud menor que la de los otros isómeros ( $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ ). En general este orden de solubilidades ( $\delta > \gamma > \alpha > \beta$ ) es el mismo que el encontrado en la mayoría de datos bibliográficos. Los datos experimentales obtenidos para los isómeros  $\alpha$ - y  $\beta$ -HCH se aproximan a los datos de Kurihara et al. (1973), Weil et al. (1974) y Mackay et al. (1997), mientras que para los isómeros  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH no hemos encontrado en la bibliografía solubilidades similares a las experimentales y todos los datos encontrados son superiores a los obtenidos en el laboratorio.

La solubilidad de los isómeros de HCH es muy importante en los procesos de sorción puesto que (1) los procesos de sorción son resultado de una transferencia del compuesto desde la fase líquida al sólido y (2) la concentración en la disolución con la que realizamos los ensayos de sorción no debe sobrepasar el límite de solubilidad en la disolución acuosa, puesto que esto puede llevar a errores, interpretando la precipitación como sorción. Shin et al. (1970) trabajaron con DDT a concentraciones superiores a la de solubilidad en agua ( $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) y en las isotermas que obtuvieron interpretan que a concentraciones de equilibrio superiores a  $2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  la precipitación contribuye a aumentar la desaparición de DDT en la disolución acuosa, y a concentraciones superiores a  $4 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  la precipitación es el principal mecanismo de desaparición.

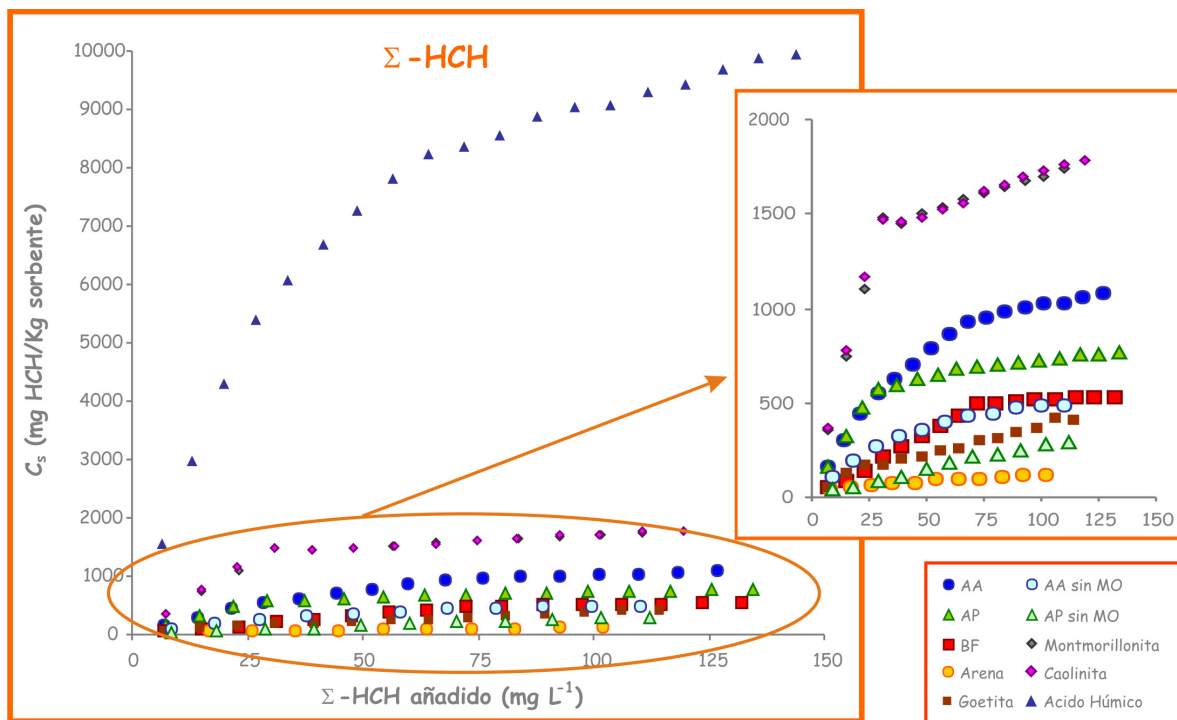
**Tabla 2.2:** Solubilidad de los isómeros de HCH.

	Solubilidad (mg L <sup>-1</sup> )			
Procedencia de los datos	α-HCH	β-HCH	γ-HCH	δ-HCH
Resultado experimental	2,38 ± 0,54	0,20 ± 0,06	4,94 ± 1,11	5,61 ± 0,76
Weil et al., 1974; Xiao et al., 2004	2,00	0,240	7,85	
Kurihara et al., 1973; Xiao et al., 2004	2,03	0,200	7,27	
Kanazawa et al., 1971; Xiao et al., 2004	1,63	0,701		
Slade, 1945	10,00	5,00		
Clayton et al., 1981	10	5		10
Prager, 1995	10	5	7,3	10
Isnard and Lambert, 1988; Xiao et al., 2004		1,60		
Lipke and Kearns, 1960; Xiao et al., 2004			8,73	
Richardson and Miller, 1960			7,27	
Masterton and Lee, 1972; Xiao et al., 2004			7,52	
Hollifield, 1979			17	
Paschke and Schuurmann, 2000	1,51	0,124	6,27	9,20
Mackay et al., 1997	1,6	0,32	6,2	9,0

### **Curvas de sorción**

Tras realizar los ensayos de sorción mediante el método de las adiciones sucesivas de la mezcla de isómeros  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH a los 10 sorbentes se representó la concentración de  $\Sigma$ -HCH retenido frente a la concentración de HCH total añadido (Figura 2.2). A partir de estos resultados se observó que la retención aumentó proporcionalmente al aumentar la cantidad de HCH añadido hasta un punto en que la sorción se hacía mucho más lenta, este cambio en la pendiente de la curva se produjo cuando la sorción llegó al 70-90% del total retenido.

El orden de afinidad de los diferentes sorbentes por el HCH fue: ácido húmico >> caolinita  $\approx$  montmorillonita > A-A > A-P > B-F > A-A sin MO > goetita > A-P sin MO > arena. La retención de HCH en ácido húmico alcanzó los 10 g de HCH por kg de sorbente, mucho mayor que en los otros sorbentes y del orden de 10 veces mayor que la retención en las arcillas, en las que tanto en caolinita como en montmorillonita la retención fue de 1,7 g HCH kg<sup>-1</sup>. Estos minerales de la arcilla, montmorillonita y caolinita, presentaron comportamientos casi idénticos, ambos mostraron la misma afinidad por los isómeros de HCH, con un cambio de pendiente muy marcado tras la cuarta adición de disolución contaminada. Esta similitud en su comportamiento indicaba que no existe retención en las intercapas de montmorillonita, como cabría esperar, y que la retención se dio únicamente sobre la superficie externa de la arcilla. De las muestras de suelo utilizadas (A-A, A-P y B-F) la muestra A-A presentó la mayor afinidad por HCH, con 1,1 gHCH retenido por kg de suelo, mientras que la muestra B-F mostró la menor afinidad, con la mitad de retención de HCH que A-A. La cantidad de HCH retenida al eliminar la MO de las muestras A-A y A-P descendió para A-P sin MO hasta los niveles de la arena, mientras que para A-A sin MO, aunque el descenso también fue importante, la cantidad de HCH retenido fue de 0,44 g kg<sup>-1</sup>, valor muy próximo a la retención en B-F y ligeramente superior a la retención en goetita.

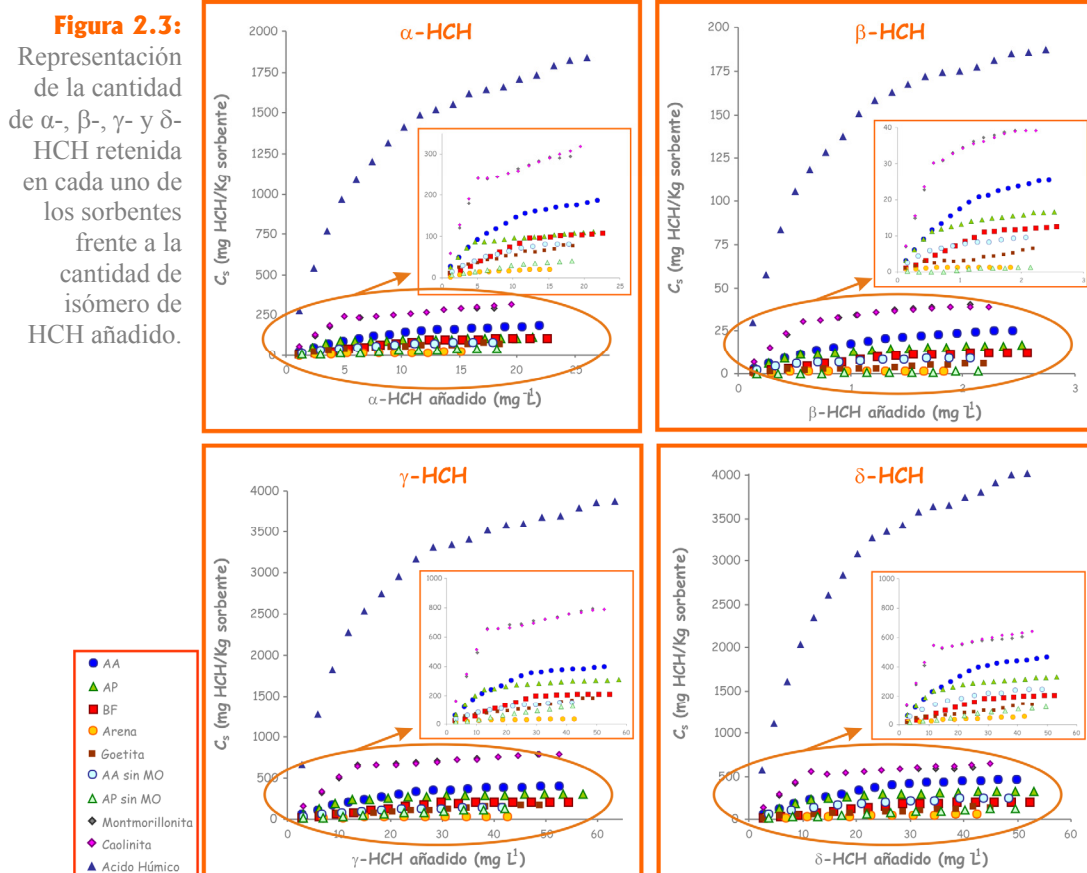


**Figura 2.2:**

Representación de la cantidad de  $\Sigma$ -HCH retenida en cada uno de los sorbentes frente a la cantidad de  $\Sigma$ -HCH añadido.

La representación de la cantidad retenida de cada uno de los isómeros de la mezcla ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH) frente a la cantidad de isómero añadida (Figura 2.3) mostró comportamientos muy similares para los cuatro isómeros. En general, el orden de afinidad de los diferentes sorbentes por cada uno de los isómeros de HCH fue el mismo que el mostrado por el  $\Sigma$ -HCH (ácido húmico >> caolinita  $\approx$  montmorillonita > A-A > A-P > B-F > A-A sin MO > goetita > A-P sin MO > arena), excepto para  $\alpha$ -HCH cuya adsorción en A-P y B-F fueron iguales y para  $\delta$ -HCH cuya adsorción en A-A sin MO fue mayor que en B-F. Las proporciones entre los cuatro isómeros retenidos se mantuvieron en los

diferentes sorbentes y el punto en el cambio de pendiente en las curvas de sorción también coincidió en todos los isómeros de HCH, lo que indicó que los cuatro isómeros se comportaban de forma similar para un mismo sorbente, ocupando los sitios de sorción indistintamente y compitiendo todos por igual, sin existir retención preferencial de ninguno de los isómeros. Este comportamiento nos permitió tratar a la mezcla como un solo contaminante, aunque estudiamos también los isómeros por separado para evaluar la existencia de posibles diferencias entre ellos.





Las isothermas de sorción se obtuvieron mediante la representación gráfica de la concentración de HCH retenido ( $C_s$ ) frente a la concentración de HCH en la disolución una vez alcanzado el equilibrio ( $C_e$ ). En las Figuras 2.4, 2.5, 2.6 y 2.7 se muestran las isothermas obtenidas para cada uno de los isómeros, y los ajustes de los datos al modelo lineal y al modelo de Freundlich, con sus correspondientes coeficientes de regresión al cuadrado ( $R^2$ ), constante de sorción ( $K_d$ ) (derivado del ajuste lineal) y constantes de Freundlich ( $K_f$  y  $1/n$ ) (derivadas del ajuste de Freundlich). En la Figura 2.8 se muestran las isothermas obtenidas para  $\Sigma$ -HCH ajustando los datos a los modelos lineal y de Freundlich. En la Tabla 2.3 se muestran los parámetros obtenidos tras el ajuste de los datos de  $\Sigma$ -HCH a los modelos: lineal, de Freundlich y de Langmuir.

De acuerdo con lo indicado anteriormente, para los distintos isómeros de HCH y para el  $\Sigma$ -HCH la forma de las isothermas en cada uno de los sorbentes es la misma, indicando el mismo tipo de sorción en un sorbente dado. Sin embargo, las isothermas presentan formas diferentes según el sorbente, lo que refleja que no existe un único mecanismo de interacción HCH-sorbente, debido a la naturaleza heterogénea de las distintas superficies.

Las isothermas de HCH son de tipo L para las muestras: A-A, A-P, montmorillonita, caolinita y ácido húmico, y de tipo S para las muestras: A-A sin MO, A-P sin MO, B-F, goetita, y arena. Las isothermas tipo L indican una disminución en las posiciones de sorción libres al aumentar la cantidad de sorbato retenido. En general, son de tipo L las isothermas de los sorbentes que tienen mayor capacidad de retención; estos sorbentes retienen preferentemente a los isómeros de HCH y el agua no puede competir con ellos por los sitios de sorción. Las isothermas tipo S sugieren una interacción específica moderada entre las moléculas de sorbato y el sorbente, así como una competencia entre las moléculas retenidas en el sorbente, las moléculas de sorbato en disolución y las moléculas de agua. El hecho de que al eliminar la MO de las muestras A-A y A-P las isothermas cambien de tipo L a tipo S pone de manifiesto que en la retención sobre la MO las moléculas de disolvente no pueden competir con el HCH mientras que en la retención sobre los otros componentes del suelo hay competencia de sorción entre HCH y agua. Además, en estas muestras el contenido de arcilla es bajo, y esto hace que la diferencia entre las muestras con

y sin MO sean más marcadas. El comportamiento de los isómeros por separado coincide con el comportamiento del  $\Sigma$ -HCH, también en el caso del ajuste de Langmuir (datos no mostrados para los isómeros individuales).

En general, los datos de los adsorbentes que más retienen y que muestran una isoterma tipo L se ajustan bien para los tres modelos (lineal, Freundlich y Langmuir), mientras que los que retienen menos y tienen forma tipo S se ajustan peor (Tabla 2.3). No obstante, en la mayoría de los casos el mejor ajuste se obtiene para el modelo de Freundlich, salvo para montmorillonita, caolinita y A-P, que se ajustan mejor al modelo de Langmuir, y para B-F, que se ajusta mejor al modelo lineal. En las muestras en las que  $1/n$  es próximo a 1 el ajuste del modelo lineal es casi tan bueno como el modelo de Freundlich.

Para poder comparar las constantes obtenidas de la aplicación de los diferentes modelos, debemos tener en cuenta que son parámetros empíricos y no teóricos, se obtienen como resultado del ajuste de los datos experimentales y por ello su variación depende mucho de la bondad del ajuste. Un mal ajuste genera unos parámetros sin sentido.

En nuestro ensayo, el coeficiente de Freundlich ( $K_f$ ) resultó seguir el mismo orden de variación que la capacidad de retención, excepto para algunos datos que se ajustaban muy mal a la ecuación de Freundlich. El  $K_f$  obtenido para  $\Sigma$ -HCH en los diferentes adsorbentes variaba entre 0,001 en A-P sin MO y 2964 para el ácido húmico. Los resultados obtenidos para las arcillas están en torno a 300, y son ligeramente inferiores para A-A y A-P. Para las muestras con menor retención (B-F, A-A sin MO, A-P sin MO goetita y arena) la  $K_f$  fue inferior a 7 (Tabla 2.3).

Los datos de  $Q_{\max}$  (capacidad máxima de adsorción) obtenidos tras el ajuste de Langmuir para aquellas isothermas con forma L (A-A, A-P, montmorillonita, caolinita y ácido húmico) muestran la misma tendencia que veíamos en la capacidad de retención (Figura 2.2): ácido húmico  $\gg$  caolinita/montmorillonita  $>$  A-A  $>$  A-P. Los valores de  $K_L$  (que teóricamente da una idea de la fortaleza de la interacción) obtenidos son bastante aleatorios aunque, en general, vemos que para aquellos sorbentes en los que se observó menor retención (AP sin MO, BF, arena, goetita y AA sin MO) la  $K_L$  es mucho menor.

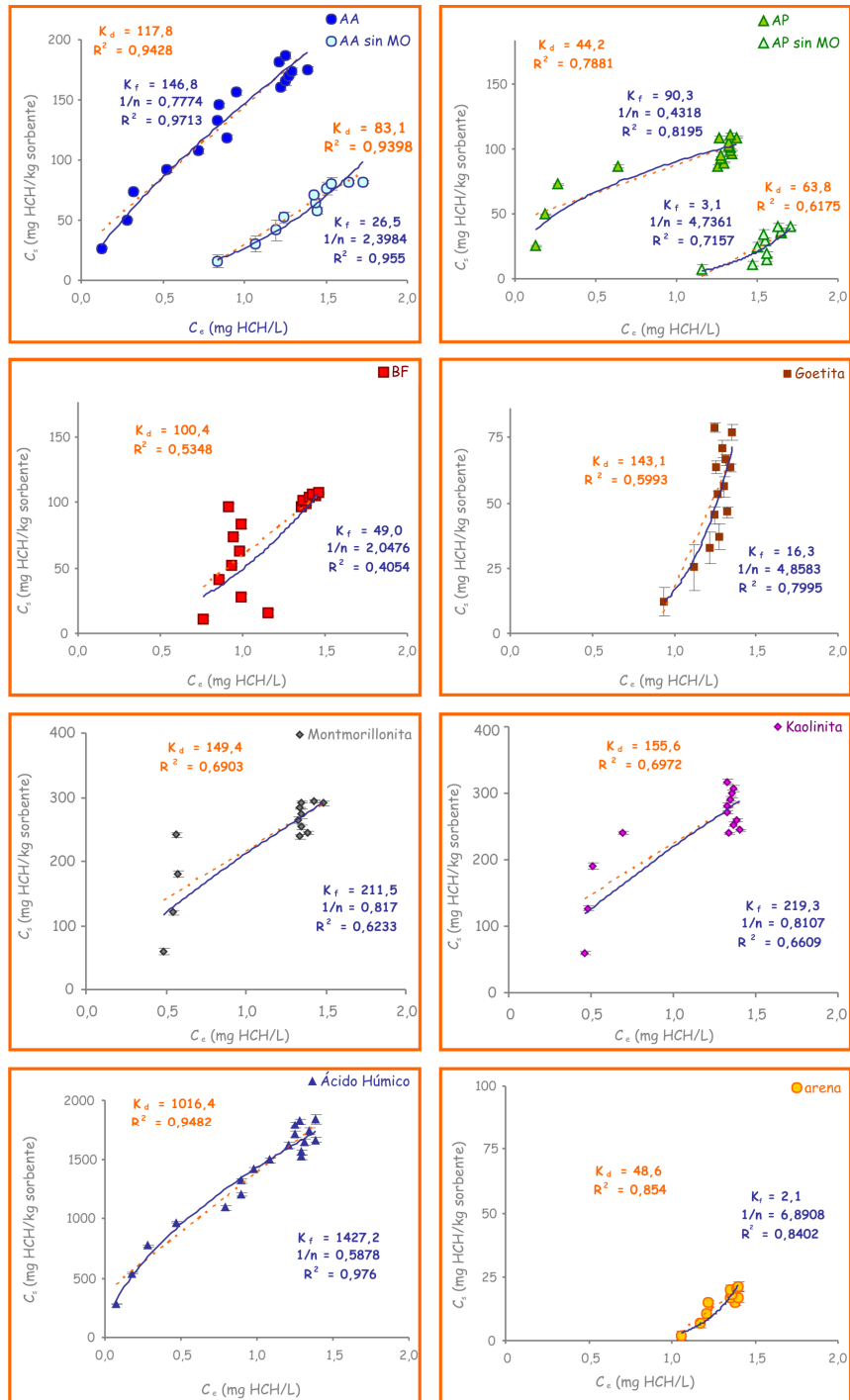
Los datos de la constante de distribución ( $K_d$ ) obtenidos tras el ajuste lineal mostraron una tendencia similar, aunque en aquellos casos en que  $r^2$  es muy bajo se obtienen datos aleatorios. La  $K_d$  es la constante experimental de un reparto lineal, por tanto, cuando hay un cambio de pendiente, o los datos no son lineales, esta constante pierde su significado.

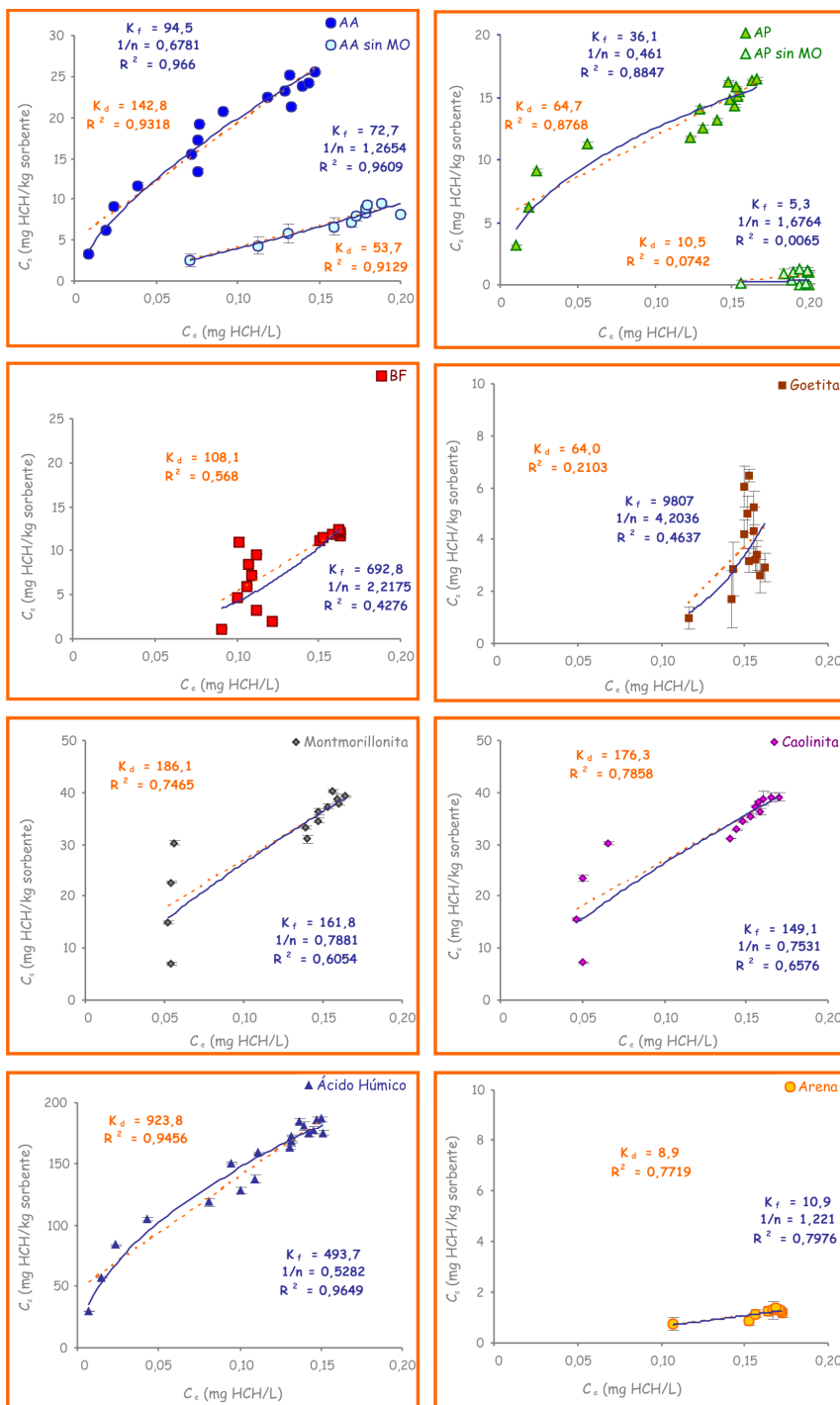
**Tabla 2.3:**

Parámetros obtenidos tras los ajustes: lineal, de Freundlich y de Langmuir para  $\Sigma$ -HCH.

	Langmuir			Lineal		Freundlich		
	$K_L$ (L/g)	$Q_{max}$ (mg/g)	$R^2$	$K_d$ (L kg <sup>-1</sup> )	$R^2$	$K_f$ (mg <sup>1-1/n</sup> L <sup>1/n</sup> kg <sup>-1</sup> )	1/n	$R^2$
A-A	0,134	2,028	0,953	111,1	0,927	246,8	0,716	0,962
A-P	0,576	0,854	0,910	53,0	0,860	283,5	0,441	0,856
B-F	0,006	9,748	0,446	93,4	0,549	3,69	2,325	0,444
Arena	0,027	0,447	0,373	21,9	0,618	0,371	2,479	0,706
Montmorillonita	0,126	3,113	0,699	136,3	0,681	313,1	0,770	0,616
Caolinita	0,131	3,115	0,746	139,9	0,717	325,4	0,761	0,658
Ácido húmico	0,210	14,94	0,943	966,2	0,951	2963,5	0,566	0,978
Goetita	0,011	3,319	0,195	121,2	0,437	0,002	5,770	0,705
A-A sin MO	0,009	1,331	0,360	68,5	0,946	6,69	1,854	0,973
A-P sin MO	0,008	2,618	0,154	75,4	0,376	0,001	5,554	0,508

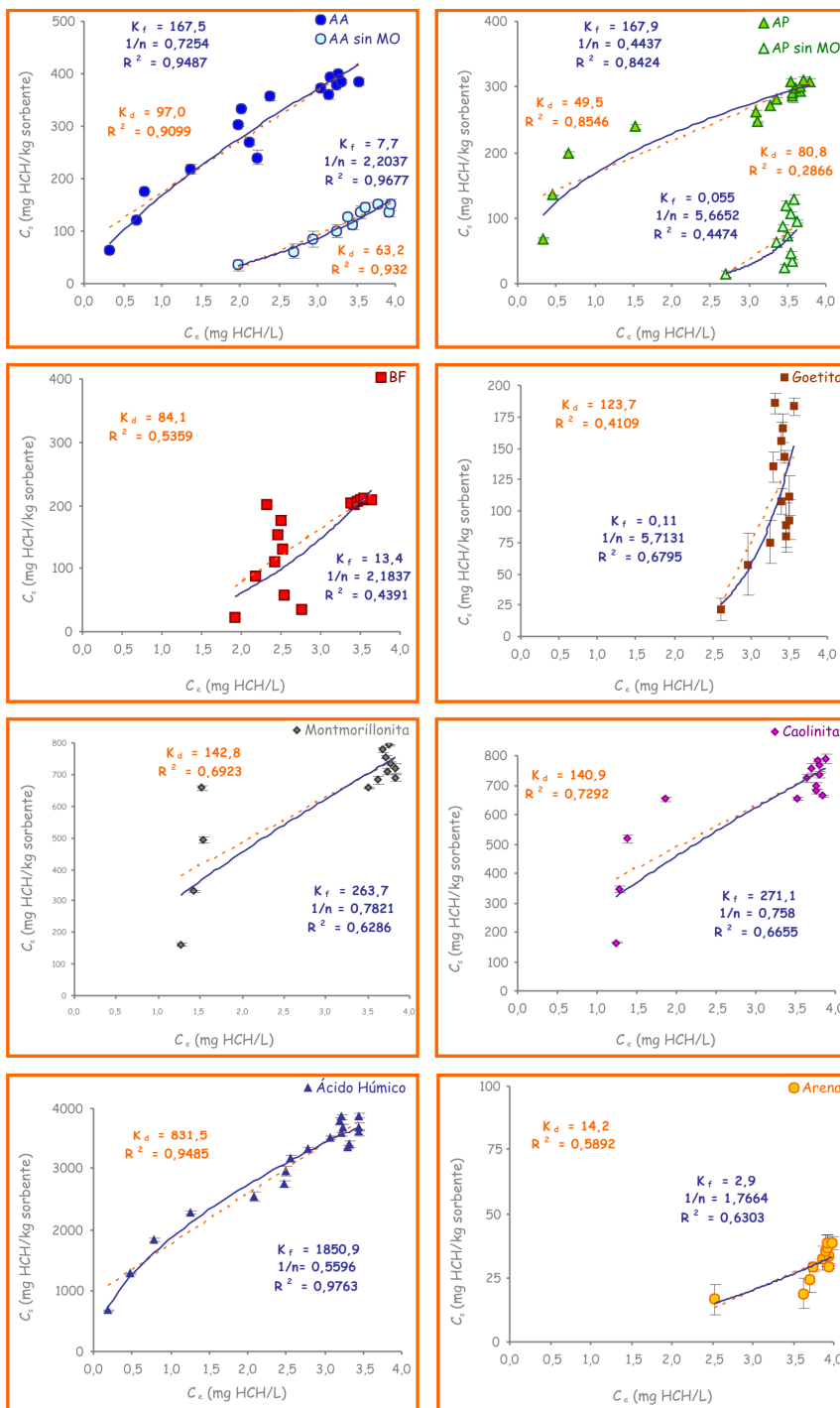
**Figura 2.4:**  
Isotermas de  
sorción lineal y de  
Freundlich del  
isómero  $\alpha$ -HCH en  
cada uno de los  
sorbentes.

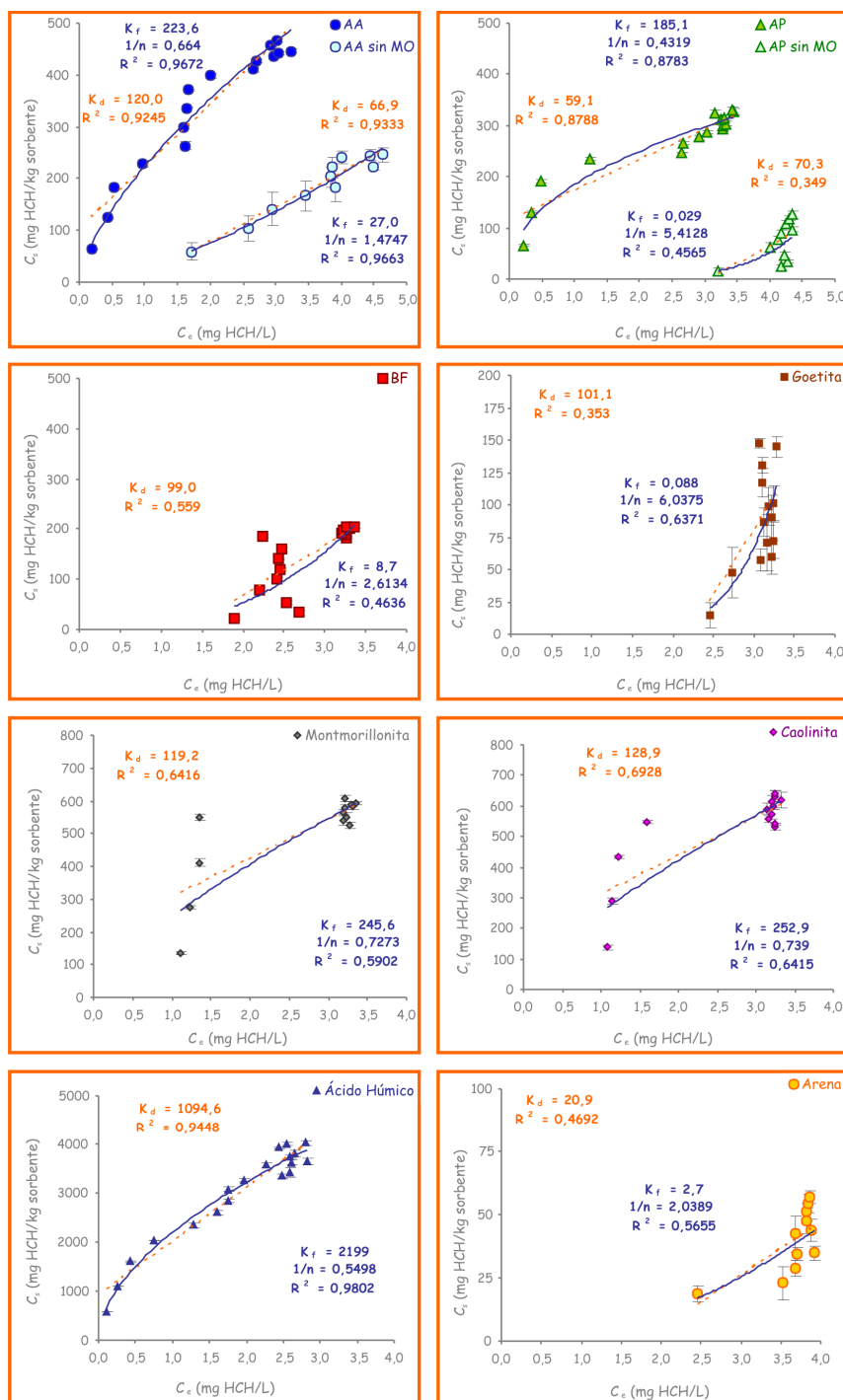




**Figura 2.5:** Isotermas de sorción lineal y de Freundlich del isómero  $\beta$ -HCH en cada uno de los sorbentes.

**Figura 2.6:** Isotermas de sorción lineal y de Freundlich del isómero  $\gamma$ -HCH en cada uno de los sorbentes.

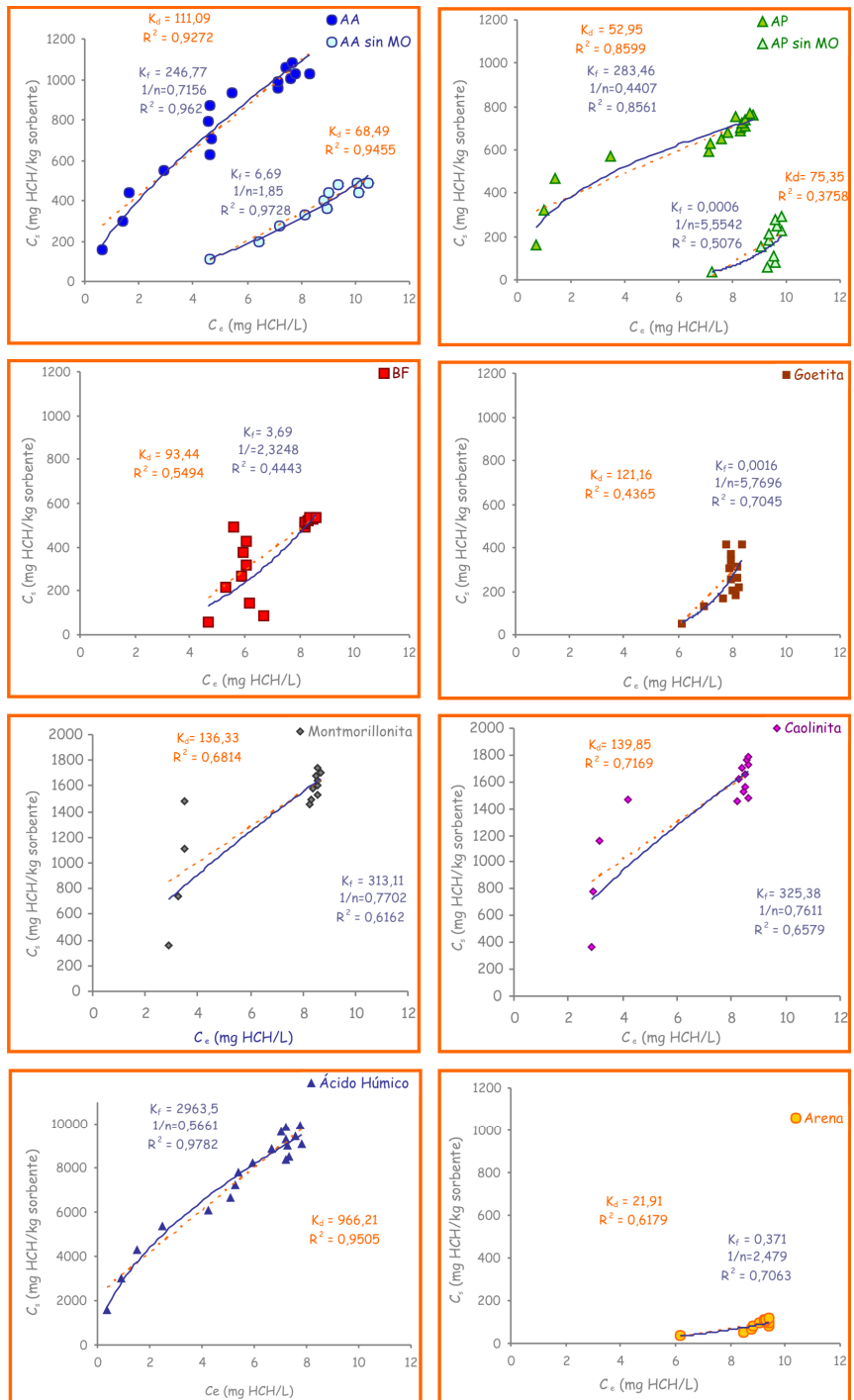




**Figura 2.7:**

Isotermas de sorción lineal y de Freundlich del isómero  $\delta$ -HCH en cada uno de los sorbentes.

**Figura 2.8:**  
Isotermas de sorción lineal y de Freundlich del  $\Sigma$ -HCH en cada uno de los sorbentes.





### Sorción sobre superficies minerales

Los resultados obtenidos para las dos arcillas, la goetita y los suelos en los que se ha eliminado la MO indican que algunos componentes minerales del suelo pueden tener una importante relevancia en los fenómenos de sorción de los isómeros de HCH. La importancia de la sorción de los componentes minerales del suelo se hace mayor en ausencia de MO, puesto que ésta enmascara el efecto de los otros componentes del suelo o bien interfiere en la retención sobre los otros compuestos. Según nuestros resultados, las arcillas pueden ser importantes sorbentes de HCH, mientras que la arena y el oxi-hidróxido de hierro son sólo de limitada importancia. Estos datos están de acuerdo con los obtenidos por Clausen et al. (2004) para pesticidas no iónicos. Los estudios de Celis et al. (1999) sobre la sorción del fungicida triadimeron en diferentes tipos de suelos indicaban que el papel de la arcilla se hacía particularmente evidente cuando el contenido en arcilla era elevado y el contenido de materia orgánica era relativamente bajo (relación arcilla:CO > 25).

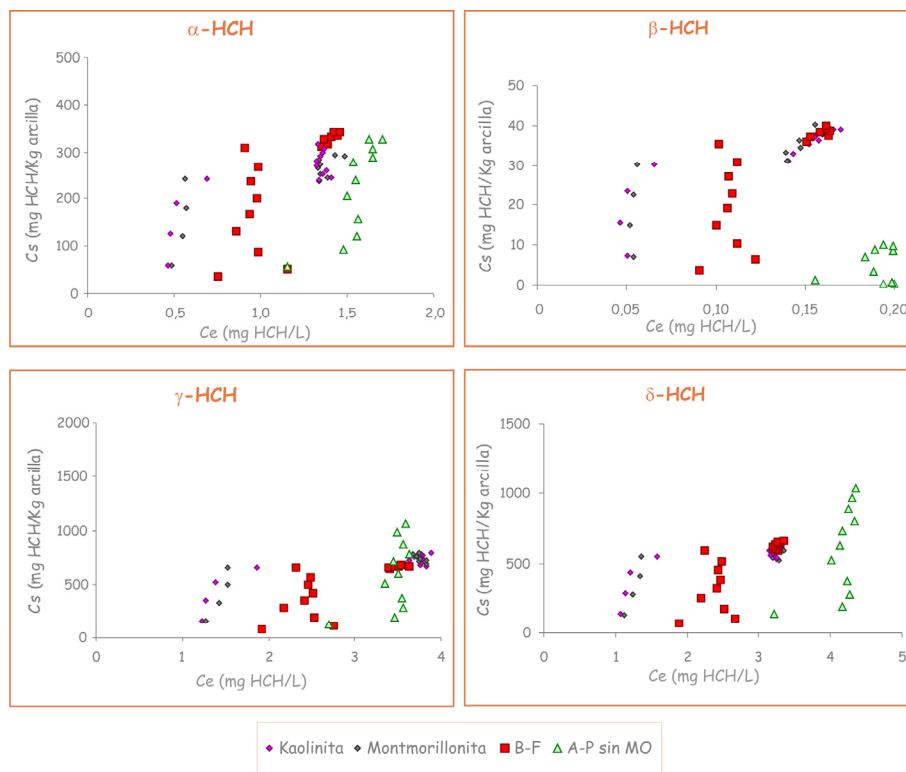
Si comparamos el resultado obtenido para las dos arcillas de este estudio encontramos un comportamiento muy similar entre la caolinita y la montmorillonita (Figuras 2.2 y 2.3). Yaron et al. (1967) encontraron también coincidencia entre estas dos arcillas en la adsorción de aldrin; de hecho, en la representación de la isoterma se solapaban los datos. El hecho de que no haya diferencias en la adsorción por los dos tipos de arcilla sugiere que no hay retención en las intercapas de montmorillonita como cabría esperar.

Representando los datos de sorción de los suelos en base a la cantidad de arcilla podemos ver que las muestras B-F y A-P sin MO presentan el mismo orden de magnitud de sorción que las dos arcillas estudiadas, montmorillonita y caolinita, lo que podría indicar que en ausencia de materia orgánica son las arcillas presentes en estos suelos las responsables de la retención de los isómeros de HCH (Figura 2.9). Estos datos apoyan la hipótesis de que en ausencia de MO la retención en superficies minerales se hace más importante. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Hundal et al. (2001). Estos autores mostraron que las esmectitas, un mineral frecuente en muchos suelos, jugaba un papel importante en el destino y transporte de COH en el medio ambiente. De forma concreta, estudiaron la retención fenantreno por distintas esmectitas de

referencia y, obtuvieron niveles de retención comparables a los de suelos arcillosos ricos en materia orgánica (en torno al 4%). La adsorción de fenantreno para las diferentes montmorillonitas estudiadas variaba entre 10 y 40 mg/kg de arcilla, cantidades del mismo orden a las encontradas en nuestro estudio para la misma cantidad de HCH añadido. La correlación ente la constante de Freundlich calculada y los índices de carga o hidrofobicidad sugirieron que la sorción de fenantreno por las esmectitas era un fenómeno físico

La adsorción de HCH sobre goetita fue muy inferior a la obtenida para caolinita y montmorillonita (casi 10 veces menor) y en estas muestras no hemos encontrado una buena correlación entre la cantidad de HCH sorbido y la concentración en el equilibrio con ninguno de los modelos usados. Esta falta de ajuste es debida a la baja retención de los isómeros de HCH en este sorbente. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Yost and Anderson (1984). Estos autores realizaron estudios de adsorción en serie de fenol sobre goetita y, después de verificar que no hay biodegradación, volatilidad, fotodegradación, ni adsorción sobre el material de laboratorio, concluyen que no hay adsorción de fenol sobre goetita.

**Figura 2.9:**  
Cantidad de  
HCH retenida  
por Kg de arcilla  
frente a la  
cantidad de HCH  
en la disolución  
de equilibrio.



## Influencia de la MO en la sorción

Los resultados obtenidos en este estudio ponen de manifiesto la importancia de la materia orgánica en la retención de HCH. La retención descendió drásticamente en las muestras de suelo A-A y A-P cuando se eliminó la materia orgánica. El ácido húmico retuvo hasta 10 veces más que las muestras A-A y A-P alcanzándose en estas una retención de 1080 y 767 mg HCH kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Yaron et al. (1967) estudiaron el efecto de la MO sobre la sorción de aldrin en un suelo con 5,95% de MO y la misma muestra oxidada con peróxido de hidrógeno, encontrando que la muestra con MO (sin atacar con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) retenía un 44% más de aldrin que la misma muestra sin MO.

La elevada importancia de la MO también se refleja en los elevados coeficientes de correlación ( $r^2 > 0,97$ ) obtenidos entre los valores de  $K_f$  y el contenido de CO de las muestras A-A, A-P y ácido húmico. En la Tabla 2.4 se muestran las constantes de Freundlich normalizadas con el contenido de CO ( $K_{CO}$ ). En general, esta constante resultó ser mayor para ácido húmico seguido de A-A y, por último, A-P, excepto para el  $\beta$ -HCH que fue un poco superior para A-A que para el ácido húmico. En la Figura 2.10 se muestra la relación entre el HCH retenido normalizado con el contenido de CO y la concentración de HCH en la disolución en el equilibrio. Vemos que la gran diferencia existente entre las muestras al calcular la retención de HCH en mg retenidos por kg de sorbente, se acortan al calcular la retención de HCH por kg de CO, aunque en este caso estamos considerando que la materia orgánica es la única responsable de la retención, y esto tampoco es del todo cierto.

**Tabla 2.4:**

Coefficiente de sorción normalizados con el contenido de carbono orgánico (CO) para los cuatro isómeros de HCH.

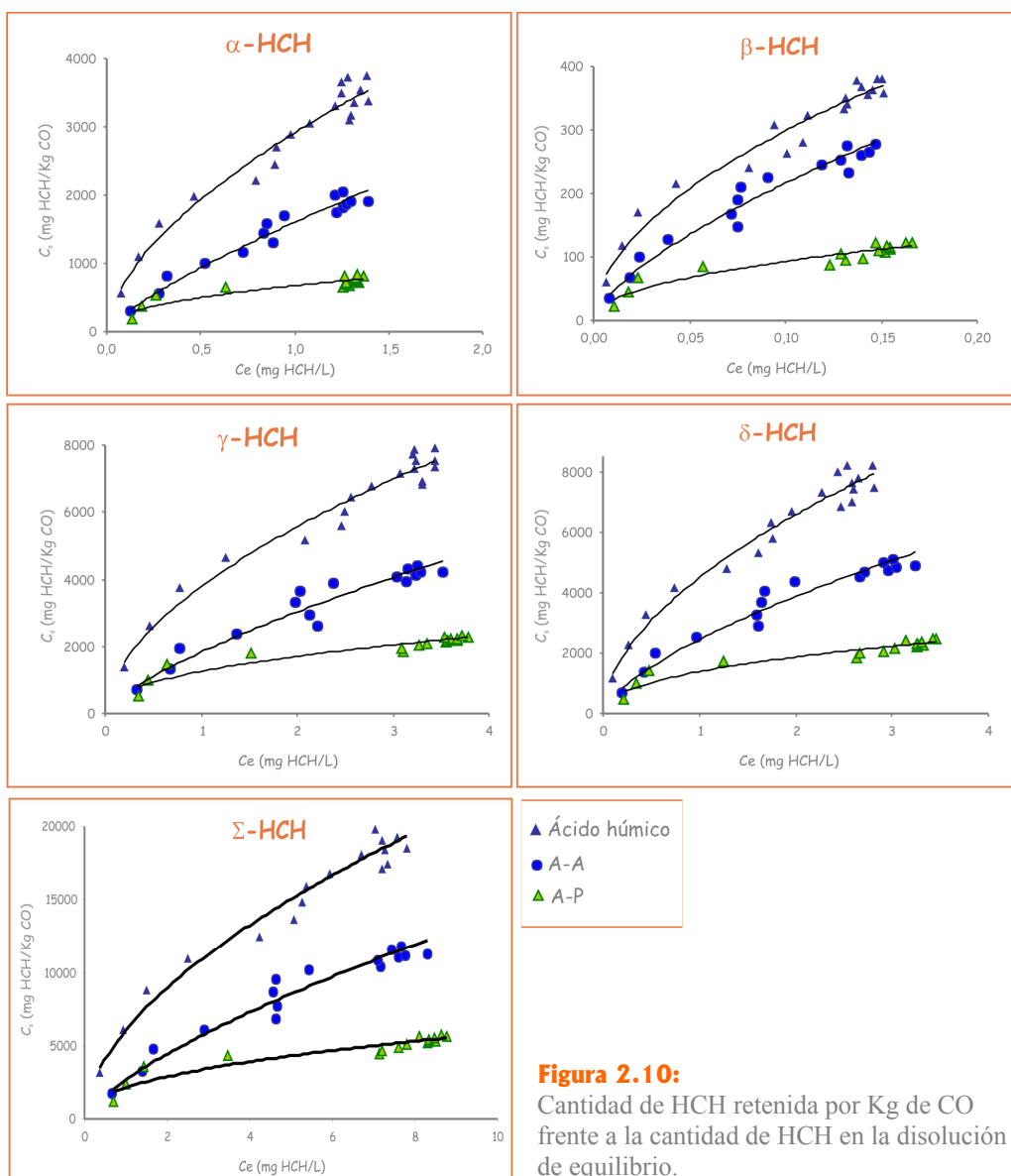
Sorbente	$\alpha$ -HCH	$\beta$ -HCH	$\gamma$ -HCH	$\delta$ -HCH
Suelo AA $K_{CO}$ (mg kg CO <sup>-1</sup> )	1602,2	1031,5	1828,6	2440,8
Suelo AP $K_{CO}$ (mg kg CO <sup>-1</sup> )	674,7	269,5	1255,0	1383,5
Acido Húmico $K_{CO}$ (mg kg CO <sup>-1</sup> )	2912,1	1007,4	3776,6	4486,8

Generalmente se ha dicho que la retención de compuestos hidrofóbicos está altamente relacionada con el contenido de CO del suelo y que es relativamente independiente de las otras propiedades del suelo (Karickhoff et al., 1979; Lambert, 1967), si esto fuera así el valor de  $K_{CO}$  para un mismo compuesto debería ser el mismo, independientemente del suelo usado como sorbente, sin embargo en muchos casos el valor de  $K_d$  no se correlaciona bien con el contenido de MO (Ahmad et al., 2001). En este estudio, las diferencias entre las  $K_{CO}$  obtenidas para los distintos adsorbentes junto con el hecho de que la muestra A-A (9,16% de C) presentara mayor retención que la muestra A-P (13,38 % de C) pone de manifiesto la importancia del tipo de materia orgánica. La materia orgánica del suelo A-P está mal humificada, tiene más grupos funcionales ácidos y está menos complejada por Al y Fe (características que favorecen su movilización en el perfil), mientras que la MO del suelo A-A es más aromática y está bien humificada y estabilizada por complejos organo-alumínicos, tal y como indica el elevado valor de Al extraído con pirofosfato (Tabla 2.1). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Ahmad et al. (2001). Estos autores estudiaron la sorción de dos pesticidas no iónicos, 1-naftil metilcarbamato (carbaril) y S-6-cloro-2,3-dihidro-2-oxobenzoxazol-3-ylmetilO,O-dietil fosforoditionato (fosalón), y encontraron que las variaciones de  $K_{CO}$  no son debidas sólo a la cantidad de materia orgánica sino a su composición estructural, encontrando una elevada correlación entre  $K_{CO}$  y la aromaticidad de la MO.

El papel de la materia orgánica ha sido estudiado en otros trabajos, en los que tras la eliminación del CO del suelo con diferentes extractantes (etanol, agua caliente, HCl al 2%) o por oxidación con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) se reducía siempre la cantidad de COHs retenidos (Delle Site, 2001). Clausen et al. (2004) también hicieron estudios de sorción sobre sedimentos naturales y tratados con  $H_2O_2$ . El tratamiento con  $H_2O_2$  eliminaba aproximadamente el 80% de la materia orgánica de los sedimentos y reducía la capacidad de sorción en más del 50%. Sus resultados indicaban que la estructura y las características del carbono orgánico en sedimentos reducidos diferían sustancialmente del carbono orgánico en sedimentos oxidados y que el tipo o naturaleza de la materia orgánica afecta a la magnitud de la sorción. El conocimiento de los efectos de la

estructura de la materia orgánica sobre la sorción es todavía limitado. Hay pocos estudios relacionados con la composición del carbono orgánico del suelo y la capacidad de sorción y encuentran que la capacidad de sorción de compuestos no iónicos está asociada con contenidos bajos de oxígeno, contenido alto de aromáticos y descenso de la polaridad.

Comparando los resultados de retención obtenidos con las muestras A-A y A-P con las mismas muestras a las que se ha eliminado la MO vemos que la retención se redujo a menos de la mitad. Suponiendo que la fracción orgánica es la responsable de la diferencia de adsorción encontrada entre las muestras tratadas y sin tratar, obtenemos que la MO es la responsable del 55% de la retención en el caso de la muestra A-A y del 61% en la muestra A-P. Si nos fijamos en los isómeros individuales la MO del suelo AA sería la responsable del 62,3, 67,8, 67,5 y 54,5% de retención de los isómeros  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH respectivamente, mientras que en el suelo AP la MO es la responsable del 70,4, 94,0, 65,9 y 68,5% de la retención  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH, respectivamente. En el suelo AP la retención de los isómeros por la materia orgánica tiene mayor importancia que en el suelo AA, esto se debe a que la muestra A-P sin MO es prácticamente arena. Además, estos resultados nos indican que en cualquiera de los suelos el isómero  $\beta$ -HCH es el más retenido por la materia orgánica y en el caso del suelo AP la MO es prácticamente el único componente que retiene a este isómero, mientras que los isómeros  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH son los que resultan menos retenidos por la materia orgánica, aunque ésta sigue siendo la responsable de más del 50 de la sorción.



**Figura 2.10:** Cantidad de HCH retenida por Kg de CO frente a la cantidad de HCH en la disolución de equilibrio.

### Conclusiones

1. Los cuatro isómeros de HCH presentan comportamientos similares para un sorbente dado, pero existen diferencias de retención entre los diferentes sorbentes estudiados, siendo el ácido húmico seguido de las arcillas montmorillonita y caolinita los que presentan mayor retención de HCH y la arena y la muestra A-P sin MO las que presentan menor retención.
2. Las isothermas obtenidas son de tipo L para aquellos sorbentes que presentan mayor retención de HCH (A-A, A-P, montmorillonita, caolinita y ácido húmico) y de tipo S para aquellas muestras que retiene poco HCH (A-A sin MO, A-P sin MO, B-F, goetita, y arena), en las que los procesos de competencia con el solvente por los sitios de sorción cobran mayor importancia.
3. La materia orgánica es el principal componente sorbente de HCH, siendo su cantidad un factor decisivo para el aumento de retención pero también su naturaleza, como reflejan los valores obtenidos de capacidad de retención normalizados para el contenido de carbono orgánico.
4. Los isómeros de HCH son retenidos en arcillas, cobrando este efecto importancia en ausencia de materia orgánica. Sin embargo no se encontraron diferencias significativas de retención entre arcillas 1:1 (caolinita) y arcillas 2:1 (montmorillonita). La retención fue muy escasa en la goetita.

## Referencias

- Ahmad, R., R.S. Kookana, A.M. Alston and J.O. Skjemstad. 2001. The nature of soil organic matter affects sorption of pesticides. 1. relationships with carbon chemistry as determined by  $^{13}\text{C}$  CPMAS NMR spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 35:878-884.
- Barreal Madroño, E. 2003. Adsorción de sulfatos en suelos con carga variable. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Benoit, P., E. Barriuso, S. Houot and R. Calvet. 1996. Influence of the nature of soil organic matter on the sorption-desorption of 4-chlorophenol, 2,4-dichlorophenol and the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Eur. J. Soil Sci.* 47:567-578.
- Bowman, B.T. 1979. Method of repeated additions for generating pesticide adsorption-desorption isotherm data. *Can. J. Soil Sci.* 59:435-437.
- Brevik, K., J.M. Pacyna and J. Münch. 1999. Use of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane in europe, 1970–1996. *Sci. Total Environ.* 239:151-163.
- Carmo, A.M., L.S. Hundal and M.L. Thompson. 2000. Sorption of hydrophobic organic compounds by soil materials: Application of unit equivalent freundlich coefficients. *Environ. Sci. Technol.* 34:4363-4369.
- Celis, R., W.C. Koskinen, M.C. Hermosin and J. Cornejo. 1999. Sorption and desorption of triadimefon by soils and model soil colloids. *J. Agric. Food Chem.* 47:776-781.
- Chester, G., G.V. Simsiman, J. Levy, B.J. Alhajjar, R.N. Fathulla and J.M. Harkin. 1989. Environmental fate of alachlor and metolachlor. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 110:1–74.
- Chiou, C.T. 2002. Partition and adsorption of organic contaminants in environmental systems. John Wiley and Sons, Inc., New Jersey.



- Chiou, C.T. 1989. Theoretical considerations of the partition uptake of nonionic organic compounds by soil organic matter. SSSA Special Publication 22:1-29.
- Clausen, L., F. Larsen and H. Albrechtsen. 2004. Sorption of the herbicide dichlobenil and the metabolite 2,6-dichlorobenzamide on soils and aquifer sediments. *Environ. Sci. Technol.* 38:4510-4518.
- Clayton, G.D. and F.E. Clayton. 1981. Patty's industrial hygiene and toxicology, 3rd rev. ed., Vol. 2B: Toxicology. John Wiley and Sons. New York.
- Delle Site, A. 2001. Factors affecting sorption of organic compounds in natural Sorbent/Water systems and sorption coefficients for selected pollutants. A review. *J. Phys. Chem. Ref. Data.* 30:187-439.
- FAO. 1990. Mapa mundial de suelos. Leyenda revisada. Informe sobre recursos mundiales de suelos N°60. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma.
- Filep, G. 1999. Adsorption and ion exchange. In *Soil Chemistry. Processes and constituents*. Akadémiai Kiadó. Budapest.
- Giles, C.H., T.H. MacEwan, S.N. Nakhwa and D. Smith. 1960. Adsorption. XI. A system of classification of solution adsorption isotherms, and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface areas of solids. *J. Chem. Soc.* 3973-3993.
- Hollifield, H.C. 1979. Rapid nephelometric estimate of water solubility of highly insoluble organic chemicals of environmental interest. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 23:579-586.
- Hundal, L.S., M.L. Thompson, D.A. Laird and A.M. Carmo. 2001. Sorption of phenanthrene by reference smectites. *Environ. Sci. Technol.* 35:3456-3461.

- Isnard, P. and S. Lambert. 1988. Estimating bioconcentration factors from octanol-water partition coefficient and aqueous solubility. *Chemosphere*. 17:21-34.
- IUSS Working Group WRB. 2007. World Reference Base for Soil Resources 2006, first update 2007. World Soil Resources Reports No. 103. FAO, Rome.
- Kanazawa, J., T. Yushima and K. Kiritani. 1971. Pollution of the ecosystem by insecticides. II. environmental pollution by organochlorine insecticides. *Kagaku*. 41:384-391.
- Karickhoff, S.W., D.S. Brown and T.A. Scott. 1979. Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. *Water Res.* 13:241-248.
- Koskinen, W.C. and S.S. Harper. 1990. The Retention Process: Mechanisms. In H. H. Cheng (ed.). *Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts, and Modeling*. Soil Science of America, Inc. Wisconsin.
- Kurihara, N., M. Uchida, T. Fujita and M. Nakajima. 1973. Studies on BHC isomers and related compounds V. Some physicochemical properties of BHC isomers (1). *Pestic. Biochem. Physiol.* 2:383-390.
- Lambert, S.M. 1967. Functional relation between sorption in soil and chemical structure. *J. Agric. Food Chem.* 15:572-576.
- Lipke, H. and C.W. Kearns. 1960. DDT-dehydrochlorinase. III. Solubilization of insecticides by lipoprotein. *J. Econ. Entomol.* 53:31-35.
- Macías, F. 1999. Procesos de Contaminación y Recuperación de Suelos. *Mantenimiento*. 135:15-25.
- Macías Vázquez, F., and R. Calvo de Anta. 2001. *Atlas de Galicia; los Suelos*. Xunta de Galicia, Consellería de Presidencia, Sociedade para o Desenvolvemento Comarcal de Galicia. Santiago de Compostela.

- Mackay, D., W.Y. Shiu, K. Ma and Editors. 1997. Illustrated handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals, volume V: Pesticides. 800.
- Masterton, W.L. and T.P. Lee. 1972. Effect of dissolved salts on water solubility of lindane. *Environ. Sci. Technol.* 6:919-921.
- Paschke, A. and G. Schuurmann. 2000. Concentration dependence of the octanol/water partition coefficients of the hexachlorocyclohexane isomers at 25°C. *Chem. Eng. Technol.* 23:666-670.
- Porta Casanellas, J., M. López-Acevedo and C. Roquero. 1999. *Edafología, para la agricultura y el medio ambiente*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Prager, J.C. 1995. Environmental Contaminant reference book. Volume I. Van Nostrand Reinhold. New York, NY.
- Richardson, L.T. and D.M. Miller. 1960. Fungitoxicity of chlorinated hydrocarbon insecticides in relation to water solubility and vapor pressure. *Can. J. Bot.* 38:163-175.
- Schwitzguebel, J., J. Meyer and P. Kidd. 2006. Pesticides removal using plants: Phytodegradation versus phytostimulation. p. 179-198. In M. Mackova, D.N. Dowling and T. Macek (eds.) *Phytoremediation and rhizoremediation. Theoretical Background*, vol 9A. Springer, The Netherlands.
- Shin, Y., J.J. Chodan and A.R. Wolcott. 1970. Adsorption of DDT by soils, soil fractions, and biological materials. *J. Agric. Food Chem.* 18:1129-1133.
- Slade, R.E. 1945. The g-isomer of hexachlorocyclohexane (gammexane). An insecticide with outstanding properties. *Chem. Ind.* 314-319.
- Tejedor Gilmartin, M.C., M.A. Murado Garcia and G. Baluja Marcos. 1974. Contamination of the environment by chlorinated hydrocarbons. VIII. adsorption-desorption process of lindane and aldrin in an agricultural soil

and in its humic and clay components. *Anales De Quimica* (1968-1979) 70:1177-1183.

Weber, W.J., Jr., P.M. McGinley and L.E. Katz. 1991. Sorption phenomena in subsurface systems: Concepts, models and effects on contaminant fate and transport. *Water Res.* 25:499-528.

Weil, L., G. Dure and K.E. Quentin. 1974. Solubility in water of insecticide chlorinated hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in view of water pollution. *Wasser- Abwasserforsch.* 7:169-175.

Xiao, H., N. Li and F. Wania. 2004. Compilation, evaluation, and selection of physical-chemical property data for  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane. *J. Chem. Eng. Data.* 49:173-185.

Yaron, B., A.R. Swoboda and G.W. Thomas. 1967. Aldrin adsorption by soils and clays. *J. Agric. Food Chem.* 15:671-675.

Yost, E.C. and M.A. Anderson. 1984. Absence of phenol adsorption on goethite. *Environ. Sci. Technol.* 18:101-106.



## Capítulo 3

*Efecto de exudados  
radiculares sobre la  
movilidad de los isómeros  
de hexaclorociclohexano*

Publicado parcialmente en:

B. Rodríguez-Garrido, F. Macías and C. Monterroso. 2006. **Effect of low molecular weight organic acids on the mobility of hexachlorocyclohexane isomers.** (Poster). COST Action 859. 1st Scientific Workshop of WG1. Santiago de Compostela-España.

### Resumen

La vegetación y su microbiota asociada tienen un papel importante en el comportamiento de los contaminantes en el suelo. Uno de los factores a tener en cuenta es la exudación radicular, puesto que puede tener efecto sobre la biodisponibilidad de los compuestos que se encuentran en el suelo. Esto puede ser especialmente importante para los contaminantes orgánicos hidrofóbicos, como el HCH, porque puede acelerar su degradación y/o mineralización.

En este trabajo se evalúa el efecto de exudados radiculares, naturales y artificiales, sobre la movilidad de los isómeros de HCH en el suelo y se compara el efecto inducido por 15 compuestos individuales que frecuentemente forman parte de ellos. Para ello se realizaron ensayos de desorción en sistema batch utilizando un suelo de Porriño muy contaminado con  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH. Para obtener los exudados naturales se germinaron semillas de *Holcus lanatus*, una gramínea que crece en la zona contaminada de Porriño, mientras que los exudados artificiales se obtuvieron mediante la mezcla de 15 compuestos diferentes en concentraciones totales 1 y 10 mM, y los mismos 15 compuestos por separado, en concentraciones 1 y 10 mM.

Los resultados indican que tanto los exudados naturales y artificiales, como muchos de los distintos componentes de exudados estudiados favorecen la movilización de los isómeros de HCH presentes en el suelo, siendo este efecto muy importante para los isómeros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -HCH (en los que la solubilidad respecto al agua aumenta un 23,0, 26,8 y 15,5 %, respectivamente, en exudados naturales y un 40,1, 25,9 y 25,6 %, respectivamente, en exudados artificiales) y de menor importancia para el isómero delta (< 10 %).

Estos resultados tienen implicaciones en la mejora de procesos de fitocorrección de suelos contaminados por contaminantes hidrofóbicos.



### Introducción

Durante las últimas décadas se han vertido al ambiente grandes cantidades de compuestos orgánicos hidrofóbicos que se han acumulado progresivamente en suelos y biota debido a su elevada estabilidad. Algunos de ellos, como PCBs, PAHs y PCDDs/PCDFs, incluyen especies muy tóxicas y carcinogénicas y están involucrados en el transporte global (Wania and Mackay, 1996). A pesar de que se han adoptado medidas legales y mejoras tecnológicas en los procesos productivos para la minimización de sus emisiones, hay áreas que presentan una elevada contaminación por vertidos accidentales o por acumulación a partir de fuentes difusas que necesitan una descontaminación urgente. Las técnicas clásicas de descontaminación de suelos, como la extracción con disolventes y la incineración, tienen serias limitaciones derivadas de su elevado coste y efecto destructivo del recurso edáfico, por lo que en los últimos años se ha potenciado el desarrollo de técnicas sostenibles basadas en procesos biológicos (biocorrección).

Las plantas juegan un importante papel en la dinámica de los contaminantes del suelo. Esto ha permitido plantear el uso de la vegetación y su microbiota asociada para la recuperación de suelos y sedimentos contaminados, lo que globalmente se conoce con el término de “fitocorrección” (Salt et al., 1996). Se ha demostrado que esta técnica es efectiva para la descontaminación de ciertas zonas con residuos peligrosos, además de resultar una técnica económica, no destructiva y socialmente aceptada (Schnoor et al., 1995; White, 2000). Las técnicas de fitocorrección pueden dividirse en: i) técnicas que inducen la **descontaminación**, mediante procesos de extracción (fitoextracción), degradación (fito- y rizodegradación) o volatilización (fitovolatilización), y ii) técnicas que facilitan la **estabilización** del contaminante en el suelo (fitoestabilización), reduciendo su transferencia a otros medios (Cunningham et al., 1996).

Un factor clave para que estos procesos sean eficientes, es la biodisponibilidad del compuesto. La fracción biodisponible de un contaminante en el suelo es aquella que puede ser accesible a, o transformada por, organismos vivos y puede determinar la técnica de limpieza aplicable. Así, para que las

técnicas de descontaminación (fitoextracción, fito- o rizodegradación, fitovolatilización) sean efectivas la biodisponibilidad del contaminante es un requisito, mientras que la reducción de esta biodisponibilidad es el objeto de la fitoestabilización. Algunas técnicas se basan en incrementar la biodisponibilidad de los contaminantes más inmóviles mediante aplicación de calor, surfactantes o ácidos o por manipulación física (Cunningham et al., 1996).

La biodisponibilidad de los contaminantes orgánicos depende de la naturaleza del compuesto y del suelo. La solubilidad, polaridad, coeficiente de partición octanol/agua ( $K_{ow}$ ) y lipofilicidad son las principales propiedades de los contaminantes que influyen en su biodisponibilidad. Los principales componentes del suelo que influyen son la materia orgánica (tanto cantidad como naturaleza), la arcilla (aunque ésta en menor medida que la materia orgánica) y la actividad biológica. Además, la retención del contaminante en el suelo aumenta con el tiempo de permanencia como resultado de la formación de residuos fuertemente ligados (“bound-residues”) que tiene lugar durante el proceso de descomposición y humificación de la materia orgánica (efecto “aging”) (Alexander, 2000; Semple et al., 2003). En estos casos el compuesto permanece “secuestrado” en el suelo de manera que no puede interactuar con la biota ni ser metabolizado, degradado y, en algunos casos, tampoco extraído por disolventes (Cunningham et al., 1996).

Las plantas afectan a las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo (Tan, 1994) y, por tanto, al comportamiento de los contaminantes. Físicamente las plantas protegen al suelo de la erosión y de otros procesos de destrucción. Además, las raíces potencian el desarrollo de la estructura del suelo, pueden crecer a través de las grietas y cuando mueren dejan conductos para el paso de aire y agua. Químicamente, como resultado de la descomposición, las plantas liberan residuos orgánicos o rizodepósitos (mucílago y restos celulares). Además, las raíces de las plantas vivas segregan una serie de compuestos orgánicos, o exudados, que inducen un aumento importante de la actividad biológica en el entorno radicular (Tan, 1994). Estos exudados pueden dividirse en 3 grupos: (a) mucílago, que es una mezcla de polisacáridos y ácidos urónicos, (b) sustancias orgánicas celulares, producidas por el envejecimiento de la epidermis de la raíz y (c) gran variedad de ácidos orgánicos, compuestos

fenólicos, aminoácidos, azúcares y ectoenzimas. Entre un 10 y un 50% del C asimilado por las plantas a través de la fotosíntesis es eliminado por las raíces como exudados y supone una parte muy importante del ciclo biogeoquímico del C (Hinsinger et al., 2006).

La influencia de las plantas sobre los contaminantes tiene especial intensidad en la interfase raíz-suelo, una zona denominada rizosfera en la que el suelo adquiere propiedades particulares (Hinsinger et al., 2006). **Rizosfera** es un concepto propuesto por primera vez por Hiltner en 1904 y, aunque describe el volumen de suelo que está alrededor de las raíces de las plantas vivas, y que por tanto está influenciado por la actividad de las raíces, es muy difícil establecer exactamente su límite (Hinsinger et al., 2006). En esta zona tan compleja ocurren muchos procesos como la absorción de agua y nutrientes, la respiración, la rizodeposición, y se producen cambios de concentración de nutrientes, de elementos tóxicos y de contaminantes, formación de complejos o quelatos, cambios de pH y de potencial redox, etc. (Hinsinger et al., 2005). En muchos de estos procesos los ácidos orgánicos de bajo peso molecular (AOBPM) exudados por las raíces a la rizosfera juegan un papel fundamental (Jones, 1998).

Los ácidos orgánicos de bajo peso molecular (AOBPM) son compuestos que contienen C, H y O, y se caracterizan por tener uno o más grupos carboxílicos (Jones, 1998). Comprenden ácidos carboxílicos alifáticos (mono-, di- y tricarboxílicos) y aromáticos (derivados del ácido benzoico y cinámico) de hasta 300 g/mol. En la disolución del suelo, como los ácidos carboxílicos son ácidos débiles, al menos un grupo carboxílico está generalmente disociado, en forma aniónica, por lo que el término ácido carboxílico normalmente se refiere tanto a los compuestos que están en forma ácida como a los que están en forma aniónica (Strobel, 2001).

La concentración de AOBPM en la rizosfera está determinada en gran medida por la exudación de las raíces, pero está también influenciada por pérdidas debidas a reacciones en la fase sólida del suelo (adsorción y desorción), lixiviación, degradación por microorganismos del suelo y reacciones de complejación y precipitación (Ryan et al., 2001) y por otras fuentes de ácidos orgánicos, como la descomposición de materia orgánica del suelo y la exudación por microorganismos (Jones, 1998). Stevenson (1967) encontró que los AOBPM

alcanzaban su nivel de equilibrio más alto durante la descomposición de plantas. A diferencia de los ácidos grasos de cadena larga, que pueden persistir en el suelo durante largos periodos de tiempo, los AOBPM tienen una existencia transitoria y son rápidamente adsorbidos por la fase de intercambio del suelo (Jones, 1998).

En la disolución del suelo los AOBPM más abundantes son los monocarboxílicos (hasta 1mM), seguidos de los di- y tricarboxílicos (hasta 50  $\mu$ M) y los aromáticos (submicromolar) (Strobel, 2001). Sin embargo, la cantidad y tipo de AOBPM en suelos depende de la profundidad y tipo de suelos, de la vegetación y de la distancia a la raíz vegetal. El contenido de ácidos carboxílicos es mayor en las disoluciones de suelo de las capas más superficiales, donde el carbono de ácidos orgánicos carboxílicos constituye hasta el 10% del total del carbono orgánico disuelto (COD). Strobel (2001) mostró que las disoluciones de suelo de pradera, pastos permanentes y suelos forestales tenían mayor concentración de ácidos di- y tricarboxílicos comparados con suelos cultivados, mientras la concentración de los monocarboxílicos no estaba relacionada con el tipo de vegetación, encontrándose en concentraciones comparables en suelos forestales y cultivados.

La presencia de AOBPM juega un papel importante en los procesos de movilización y solubilización de nutrientes poco solubles como P (Kpomblekou and Tabatabai, 2003), en la detoxificación de metales como Zn y Al (Jones et al., 2003; Tan, 1994), y en la desorción del suelo de algunos contaminantes orgánicos persistentes, como 2,2-bis(p-clorofenil)1,1-dicloroetileno (p,p'-DDE) (White et al., 2003). Se ha mostrado que la aplicación de exudados radiculares a suelos contaminados con fenantreno (Miya and Firestone, 2001) y paratión (Hsu and Bartha, 1979) incrementaba la degradación de estos contaminantes como resultado del aumento de su biodisponibilidad.

El **hexaclorociclohexano** (1,2,3,4,5,6- $C_6H_6Cl_6$ ) ó HCH es un compuesto organoclorado del que existen ocho isómeros (2 enantiómeros  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  y  $\theta$ -HCH) que se diferencian por la posición axial o ecuatorial de los átomos de Cl en torno al anillo carbonado. Aunque el único isómero con propiedades insecticidas es el  **$\gamma$ -HCH**, o **lindano**, durante muchos años se comercializó como insecticida una mezcla de isómeros conocida como HCH técnico formada por:

$\alpha$ -HCH (55-80%),  $\beta$ -HCH (5-14%),  $\gamma$ -HCH (8-15%) y  $\delta$ -HCH (2-16%) (Breivik et al., 1999). Con el conocimiento de las propiedades nocivas de los isómeros no pesticidas de HCH se comenzó a aislar el lindano, proceso que genera un residuo enriquecido en  $\alpha$ - y  $\beta$ -HCH, principalmente. Durante años estos residuos fueron vertidos en zonas cercanas al área de producción de lindano produciendo importantes focos de contaminación, como el que se encuentra en el Polígono de Torneiros, en Porriño (Pontevedra) (Eptisa, 1999).

Debido a sus características físico-químicas, los isómeros de HCH tienen tendencia a ser adsorbidos a la materia orgánica del suelo, lo que disminuye su biodisponibilidad (Capítulo 2). Su baja solubilidad y relativamente elevada hidrofobicidad limitan su absorción y translocación en la planta, absorbiéndose preferentemente en la epidermis radicular (Calvelo Pereira et al., 2006; Schwitzguebel et al., 2006). Sin embargo, en estudios de invernadero se observó una disipación de los isómeros de HCH en la rizosfera de *Cytisus striatus* Roth y *Holcus lanatus* L. desarrolladas en suelos muy contaminados (Kidd et al., 2008). Esta disipación era atribuida a un aumento de la biodegradación del contaminante en la rizosfera derivado de un incremento de la actividad microbiana asociado a la raíz y/o a un aumento de su biodisponibilidad inducido por los exudados radiculares. Paralelamente, Calvelo Pereira et al. (2006) encontraron una reducción de la concentración de HCH, y un aumento de su solubilidad acuosa en la rizosfera de *Avena Sativa* y *Cytisus striatus* en comparación con el suelo no rizosférico en el área contaminada de Porriño.

En este trabajo se evalúa el efecto inducido por exudados radiculares y diferentes AOBPM sobre la movilidad de  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ -HCH en el suelo. Para ello se realizó un ensayo de desorción en “batch” en una muestra de suelo procedente del área contaminada de Porriño (Pontevedra), utilizando exudados radiculares naturales procedentes de *Holcus lanatus*, exudados artificiales (formados por una mezcla de 15 compuestos orgánicos en concentración total 1 y 10 mM) y los 15 compuestos orgánicos por separado (en concentraciones 1 y 10 mM de cada uno de ellos). El entendimiento del papel que juegan los exudados radiculares en la solubilización de compuestos orgánicos hidrofóbicos puede tener una implicación importante en el desarrollo de técnicas de fitocorrección de este tipo de compuestos.

## Material y métodos

### Reactivos utilizados

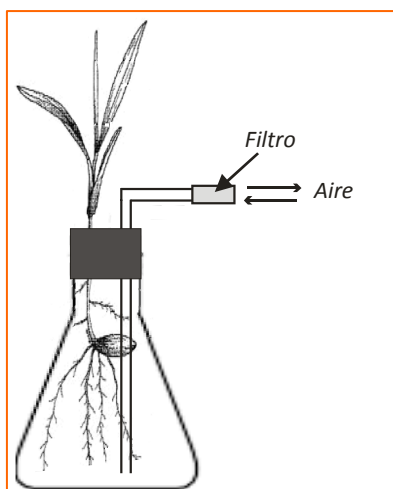
Los isómeros  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\delta$ -HCH (pureza 98,7, 98,1 y 98,6% respectivamente), proceden de Riedel-de-Haën, el isómero  $\gamma$ -HCH (pureza 99%) procede de Sigma, la acetona (pureza 99,5%) y el hexano (pureza 99,0%) proceden de Fluka.

Los ácidos cítrico (pureza 99,5%), malónico (pureza 98,9%), fumárico (pureza 99,9%), p-hidroxibenzoico (pureza 99%) y p-cumárico (pureza 98,0%) y la catequina hidratada (pureza 99,2%) proceden de Sigma; los ácidos metilmalónico (pureza 99%), pirúvico (pureza 98%), salicílico (pureza 99%) y ferúlico (pureza 99%) proceden de Aldrich; los ácidos oxálico (pureza 97%) y L(+) tartárico (pureza 99%), proceden de Merck y los ácidos caféico (pureza 95,0%) y succínico (pureza 99%) y el etanol (pureza 99,9%) proceden de Fluka.

### Obtención de exudados radiculares naturales

Para la recogida de exudados de la raíz, se germinaron semillas de *Holcus lanatus* recogidas de plantas desarrolladas sobre suelos contaminados de Porriño (Pontevedra) en julio de 2007. Las plantas se cultivaron bajo condiciones

**Figura 3.1:**  
Sistema de extracción de exudados naturales.



estériles y todas las manipulaciones se llevaron a cabo en medio estéril en una cámara de flujo laminar. La superficie de las semillas fue esterilizada usando NaClO al 2,5%, seguido por una disolución 1:5 de etanol:agua (v/v) y finalmente lavadas con agua estéril (18 MQ). Las semillas se colocaron en placas Petri de vidrio autoclavadas sobre una mezcla de vermiculita/perlita humedecida en un medio de crecimiento controlado y en una cámara de crecimiento bajo las siguientes

condiciones: 16/8 horas luz/oscuridad, temperatura día/noche de 20/15 °C, HR 70 %, y PPFD 190 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Las semillas germinaron después de 7 días, aproximadamente, y se mantuvieron cubiertas en placas Petri durante 1-2 semanas. En esta fase fueron trasladadas a frascos cónicos estériles de 25 ml, que contenían disolución nutritiva Hoagland de fuerza ½. Cada frasco contenía una planta (introducida a través de un pequeño agujero en un tapón de goma estéril y sujeta con lana de vidrio, Figura 3.1). Las disoluciones fueron aireadas a través de filtros de aire esterilizados (filtro de 0,2 mm) y se permitió el crecimiento durante 28 días en las mismas condiciones que anteriormente. Para la recogida de los exudados de la raíz las plantas fueron trasladadas bajo condiciones estériles a disoluciones de 0,4 mM CaCl<sub>2</sub>, y después de 24 horas se recogió la disolución (15-20 ml), que fue congelada a -20 °C y liofilizada. Este procedimiento se repitió hasta que se obtuvo el volumen deseado de disolución de exudados de la raíz.

En la disolución total de exudados se analizó el contenido total de carbono orgánico disuelto (DOC) utilizando un analizador de carbono orgánico total TOC-5000 (Modelo FLOWSYS, SYSTECA, Italia) equipado con un automuestreador. El contenido de carbono orgánico disuelto fue de 80,2 g L<sup>-1</sup>.

### Experimentos de desorción

Para los ensayos de desorción se utilizó una muestra de suelo contaminada con  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH, procedente del horizonte Ap de la misma parcela en la que se recogió *Holcus lanatus*. El suelo fue homogeneizado, secado a temperatura ambiente y tamizado por 2 mm. Una alícuota de este suelo fue reservada para análisis posteriores de propiedades físico-químicas y contenido total de isómeros de HCH, el resto se utilizó en los ensayos de desorción.

Los ensayos de desorción se realizaron con: 1) exudados radiculares naturales procedentes de *Holcus lanatus*, 2) exudados artificiales, formados por una mezcla de 15 compuestos orgánicos, en concentración total 1 y 10 mM, y 3) los 15 compuestos orgánicos formadores de la mezcla anterior por separado, en concentraciones 1 y 10 mM. Adicionalmente, se realizó un ensayo de desorción con agua ultrapura como control. La desorción se realizó por el método *batch*

utilizando 1 gramo del suelo contaminado y 25 ml de la disolución correspondiente. Esta suspensión se agitó durante 24 horas en agitador de vaivén y se centrifugó a 3000 rpm durante 20 minutos para separar la disolución del suelo. Se tomó una alícuota de la disolución y se extrajeron los isómeros de HCH con hexano en ultrasonidos durante 30 minutos. Los extractos orgánicos se secaron con sulfato sódico anhidro y se guardaron en nevera a 4°C para su posterior análisis cromatográfico. Este proceso se realizó por triplicado para cada uno de los extractos usados en el estudio. Los 15 compuestos orgánicos utilizados en los ensayos de desorción (Tabla 3.1) pueden dividirse en:

- **Ácidos orgánicos alifáticos:** ácido pirúvico (AP), ácido oxálico (AO), ácido malónico (AM), ácido metil-malónico (AMM), ácido succínico (AS), ácido L(+) tartárico (AT), ácido fumárico (AF) y ácido cítrico (AC).
- **Compuestos fenólicos,** entre ellos tenemos los **ácidos orgánicos aromáticos** (ácido salicílico (ASa), ácido p-hidroxibenzoico (ApH), ácido p-cumárico (ACum), ácido cafeico (ACaf) y ácido ferúlico (AFer)) y la **catequina** hidratada (Cat), que es un compuesto polifenólico del grupo de los flavonoides.
- **Etanol** (Et), que es un alcohol de cadena corta ocasionalmente presente en exudados naturales.

En la Tabla 3.1 se muestran las estructuras de los distintos compuestos junto con su peso molecular (P.M.) y logaritmo del coeficiente de partición calculado (log P). Aunque sólo 13 de los 15 compuestos son ácidos carboxílicos nos referiremos a ellos de forma genérica como AOBPM (ácidos orgánicos de bajo peso molecular).

### Análisis del suelo

Las medidas de pH se realizaron en H<sub>2</sub>O y KCl 0,1M (relación 1:2,5); los contenidos de carbono, hidrogeno y nitrógeno se analizaron por combustión en un analizador LECO (Modelo CHN-1000 LECO Corp., St Joseph, MI); la medida de los cationes de cambio (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Al<sup>3+</sup>) se realizó por espectrofotometría de absorción/emisión atómica de llama (Perkin-Elmer 2380, Norwalk, CT) tras una extracción con NH<sub>4</sub>Cl 1M (Peech et al., 1947),

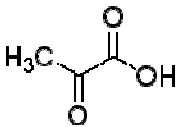
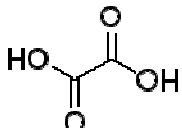
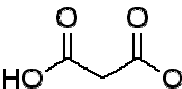
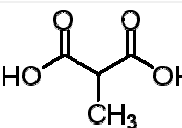
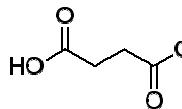
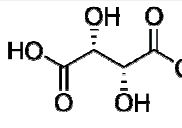
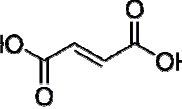


obteniéndose la capacidad de intercambio catiónico efectivo (CIC) por suma de los cationes de cambio. El análisis granulométrico se realizó siguiendo el método de la pipeta (Gee and Bauder, 1986).

La cantidad de isómeros de HCH en los extractos acuosos se determinó por GC/ECD tras la extracción con hexano:acetona (1:1) en ultrasonidos. La determinación de HCH en los extractos orgánicos se realizó usando un cromatógrafo de gases (modelo GC 8532 Mega 2 series, Fisons Instruments, Milán, Italia), equipado con un ECD (detector de captura electrónica, modelo ECD 850, Thermo Quest, Milán, Italia) y un muestreador automático (modelo AS 800, Fisons Instruments, Milán, Italia). Trabajamos con un inyector de split/splitless en modo splitless y el volumen de inyección fue de 1  $\mu$ l. Para la separación usamos una columna capilar BP $\times$ 35 de sílice fundida de 0,25 mm  $\times$  30 m. Como gas portador usamos helio, con una presión de 115 KPa y como gas auxiliar del detector N<sub>2</sub>, con una presión de 105 KPa. La temperatura del inyector era de 270 °C y la del detector de 300°C. Se ha trabajado en condiciones de gradiente de temperatura, el programa utilizado es: 60 °C (1 min), una rampa de temperatura de 30 °C min<sup>-1</sup> hasta alcanzar los 180 °C, luego hasta 230 °C con una rampa de 6 °C min<sup>-1</sup> y finalmente con una rampa de 30 °C min<sup>-1</sup>, hasta 270 °C (4 min), al terminar la temperatura desciende de nuevo a 60 °C. Los isómeros analizados fueron  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH, calculándose el  $\Sigma$ -HCH a partir de la suma de las concentraciones de isómeros individuales.

**Tabla 3.1:**

Nombre, estructura, peso molecular (P.M.) y logaritmo del coeficiente de partición calculado (Log P) de los compuestos usados en los ensayos de desorción.

Nombre	Estructura	P.M. (g mol <sup>-1</sup> )	Log P
<b>Ácidos alifáticos monocarboxílicos</b>			
<b>Ácido pirúvico (AP)</b>		88,1	- 1,24
<b>Ácidos alifáticos dicarboxílicos</b>			
<b>Ácido oxálico (AO)</b>		90,0	- 2,22
<b>Ácido malónico (AM)</b>		104,1	- 0,56
<b>Ácido metil-malónico (AMM)</b>		118,1	- 0,21
<b>Ácido succínico (AS)</b>		118,1	- 0,59
<b>Ácido L(+) tartárico (AT)</b>		150,1	- 2,20
<b>Ácido fumárico (AF)</b>		160,0	- 0,46

Ácidos alifáticos tricarboxílicos			
<b>Ácido cítrico</b> (AC)		192,1	- 1,72
Compuestos fenólicos			
<b>Ácido salicílico</b> (Asa)		138,1	2,26
<b>Ácido p-hidroxibenzoico</b> (ApH)		138,1	1,42
<b>Ácido p-cumárico</b> (ACum)		164,2	1,88
<b>Ácido cafeico</b> (ACaf)		180,2	1,42
<b>Ácido ferúlico</b> (AFer)		194,2	1,64
<b>(±) Catequina hidratada</b> (Cat)		290,3	0,49
Alcoholes			
<b>Etanol (Et)</b>	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	46,1	- 0,31

## Resultados y discusión

### Efecto de los exudados sobre la solubilidad de HCH

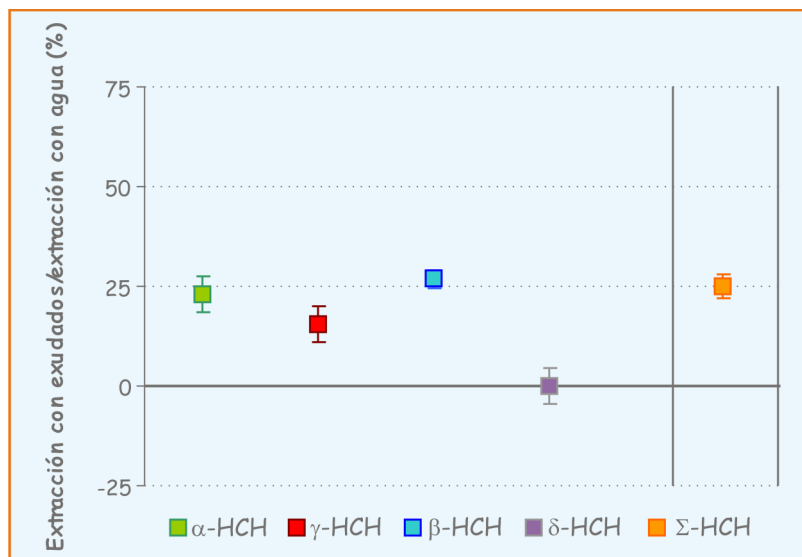
El suelo utilizado para los ensayos era un suelo ácido, franco-arenoso, rico en materia orgánica moderadamente humificada y con una capacidad de intercambio catiónico efectiva relativamente baja (Tabla 3.2). El suelo estaba muy contaminado con isómeros de HCH ( $\Sigma$ -HCH=539,6 mg/kg), siendo  $\beta$ -HCH el isómero dominante, seguido de  $\alpha$ -,  $\delta$ - y  $\gamma$ -HCH. Esta distribución de isómeros puede reflejar el envejecimiento del residuo en el suelo y/o el reciclado del residuo a través de las plantas, procesos que favorecen el enriquecimiento relativo del contaminante en el isómero  $\beta$ -HCH (Calvelo et al, 2006).

**Tabla 3.2:**

Principales propiedades del suelo utilizado en los ensayos de desorción de HCH.

	Muestra de suelo
pH (H <sub>2</sub> O)	5,8
pH (KCl)	5,0
C (g Kg <sup>-1</sup> )	64,7
N (g Kg <sup>-1</sup> )	4,41
Relación molar C:N	17,1
CIC (cmol(+) Kg <sup>-1</sup> )	16,15
Arena (%)	68,66
Limo (%)	23,44
Arcilla (%)	7,90
Textura	Franco arenoso
$\alpha$ -HCH (mg Kg <sup>-1</sup> )	18,86
$\beta$ -HCH (mg Kg <sup>-1</sup> )	517,59
$\gamma$ -HCH (mg Kg <sup>-1</sup> )	0,97
$\delta$ -HCH (mg Kg <sup>-1</sup> )	2,15

La concentración de los isómeros en la disolución obtenida después de la desorción con agua ultrapura era inferior a la solubilidad teórica en agua, lo que refleja el grado de retención a la materia orgánica del suelo y el efecto del envejecimiento por la larga permanencia del contaminante en el suelo. Los resultados obtenidos tras la desorción con los exudados naturales de *Holcus lanatus* se presenta en la Figura 3.2, normalizados con respecto a los datos de agua. Como vemos la cantidad de  $\Sigma$ -HCH extraída usando exudados radiculares aumentó en un  $25,1 \pm 3,1$  % respecto a la cantidad extraída con agua, lo que indica el efecto de los exudados radiculares sobre la disponibilidad del HCH. Este efecto era significativamente diferente ( $P < 0,01$ ) entre los cuatro isómeros. El mayor aumento de la solubilidad relativa inducido por los exudados radiculares se produjo para  $\beta$ -HCH ( $26,8 \pm 2,2\%$ ), seguido de  $\alpha$ -HCH ( $23,0 \pm 4,6\%$ ) y  $\gamma$ -HCH ( $15,5 \pm 4,3\%$ ), mientras que para el isómero  $\delta$ -HCH el efecto de la presencia de exudados era prácticamente inapreciable (del  $0,10\%$ ).



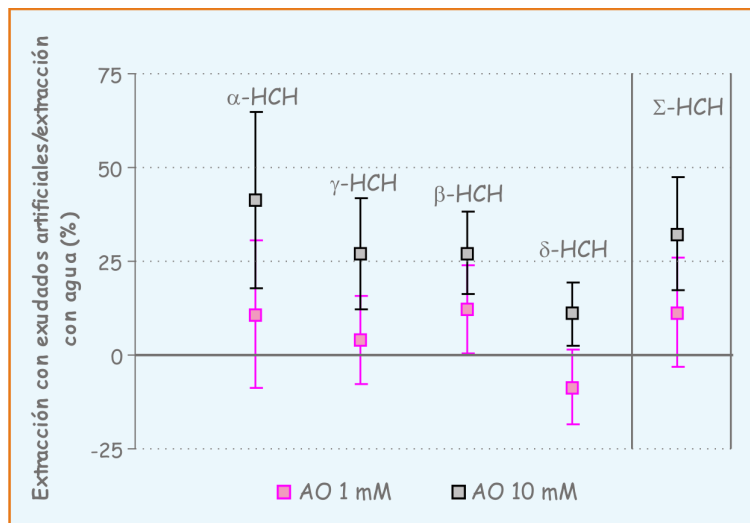
**Figura 3.2:** Incremento de extracción de HCH con exudados naturales por encima de la extracción en agua, expresado en porcentaje. La línea marcada en el cero indica igual extracción con agua ultrapura que con la disolución que contenía los exudados naturales.

De forma paralela, la mezcla de AOBPM utilizada en este ensayo indujo un incremento de la solubilidad relativa de  $\Sigma$ -HCH pero este efecto variaba con el isómero considerado y la concentración de AOBPM utilizada (Figura 3.3). La

influencia de la mezcla 1 mM era muy escasa sobre la solubilidad de  $\alpha$ -,  $\beta$ -, y  $\gamma$ -HCH (el incremento de la solubilidad para estos isómeros era inferior al 11%), mientras que el efecto era negativo para  $\delta$ -HCH. Esto quiere decir que esta mezcla tuvo un efecto neto de inmovilización del isómero  $\delta$ -HCH en el suelo. El aumento de la concentración de la mezcla a 10 mM produjo un incremento significativo de la solubilidad relativa de los cuatro isómeros, aunque de forma discreta para  $\delta$ -HCH (<10%). El incremento relativo era mayor para  $\alpha$ -HCH ( $40,1 \pm 23,6$ ), que para  $\beta$ -HCH y  $\gamma$ -HCH ( $25,9 \pm 10,9$  y  $25,6 \pm 14,8$ , respectivamente), aunque las diferencias entre los tres isómeros no eran significativas.

Comparando los resultados obtenidos con los exudados de *Holcus lanatus* y la mezcla sintética de AOBPM vemos que la desorción de los isómeros  $\alpha$ -,  $\gamma$ -, y  $\delta$ -HCH en presencia de los exudados naturales es intermedia entre las dos concentraciones de AOBPM (1 y 10 mM) y, además, presentan la misma tendencia: el incremento de la solubilidad relativa es  $\alpha > \gamma > \delta$ -HCH (en este último caso no hay efecto). Sin embargo, el comportamiento de  $\beta$ -HCH es diferente en los dos medios. El aumento de la solubilidad relativa de  $\beta$ -HCH inducido por los exudados naturales era mayor que para el resto de los isómeros y superior al inducido por la mezcla de ácidos más concentrada. Esto puede indicar que en los exudados había algún componente no incluido en la mezcla o que algunos de los ácidos que mayor contribución tienen al incremento de la solubilidad de este isómero aparece en mayor concentración en los exudados naturales.

**Figura 3.3:**  
Incremento de extracción de HCH con exudados artificiales (concentraciones 1 y 10 mM) por encima de la extracción en agua, expresado en porcentaje.



Numerosos trabajos han mostrado la implicación de los exudados radiculares en la biodisponibilidad de metales en el suelo y, aunque no existe un acuerdo general ya que los resultados dependen de la especie y las condiciones locales, muchos de ellos indicaban que las propiedades quelantes de los ácidos orgánicos de bajo peso molecular y aminoácidos potencian la movilización de los iones metálicos y su absorción por la planta (Mench et al., 1988, Mench y Martin, 1991, Jones et al., 1996, Lee et al., 1997, Krishnamurti et al., 1997, Cheng et al., 2003). Sin embargo, la influencia de los exudados sobre los contaminantes orgánicos está menos estudiada. Nardi et al. (2000) mostraron que los exudados vegetales eran efectivos en la movilización de ácidos orgánicos (C11COOH hasta C17COOH) a partir de la materia orgánica del suelo, pero este efecto variaba con la especie vegetal y las propiedades edáficas. Yang et al. (2001) proponían que la desorción de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) a partir del suelo era potenciada por la presencia de distintos ácidos orgánicos como resultado indirecto de la complejación de iones inorgánicos. Esta complejación provocaba la liberación de ácidos húmicos y, consecuentemente, un incremento de la biodisponibilidad de los HPAs previamente retenidos. De forma paralela, White y Kottler (2002) observaron un incremento similar de pp'-DDE en presencia de citrato sódico, indicando que la destrucción parcial y/o liberación de la matriz del suelo secuestrante produciría, probablemente, un incremento de la biodisponibilidad del residuo envejecido. En una línea de argumentación diferente, Hulster et al. (1995) observaron que algunas cucurbitáceas absorbían cantidades anormalmente elevadas de dioxinas y furanos a través de las raíces, a pesar de la elevada hidrofobicidad de estos compuestos. La hipótesis que planteaban estos autores era que la planta producía alguna molécula capaz de complejar directamente al contaminante. El complejo formado era más hidrofílico que el contaminante en sí mismo y llegaba a ser absorbido y translocado por la planta. En un trabajo posterior, Campanella y Paul (2000) observaron el mismo potencial en *Cucumis melo L.* y aislaron una molécula de naturaleza proteica que podría estar involucrada en este proceso.

También hay que considerar los trabajos en los que se estudia la interacción de pesticidas con la aplicación de materia orgánica disuelta (MOD) al suelo, puesto que hasta un 10% del carbono disuelto en suelos pertenece a los

AOBPM (Ryan et al., 2001). Li et al. (2005) observaron que la aplicación de MOD extraída de fertilizantes orgánicos reducía la adsorción del clorpyrifos, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y naftaleno en el suelo. Los estudios de (Flores-Cespedes et al., 2002) con el insecticida 1-(6-cloro-3-piridinil)metil-N-nitro-2-imidazolidinimina (imidacloprid) mostraron la disminución de adsorción de este contaminante en el suelo en presencia de materia orgánica soluble extraída de turba, con el consecuente aumento de lixiviación y posible llegada del contaminante a las aguas subterráneas. Estos autores atribuían la desorción de los pesticidas a que la MOD competía con ellos por los mismos lugares de adsorción.

En resumen, la desorción o la solubilidad aparente de distintos contaminantes orgánicos puede aumentar en presencia de los exudados radiculares y distintos AOBPM como resultado de: i) un efecto indirecto derivado de la desestabilización de la materia orgánica del suelo, como resultado de la complejación de iones inorgánicos o por la disolución de enlaces hidrofóbicos, que liberaría al contaminante previamente adsorbido, ii) un descenso de la hidrofobicidad del contaminante complejoado por alguna(s) molécula(s) presente e los exudados radiculares de algunas especies, o iii) la competición de los AOBPM por los mismos lugares de adsorción que el contaminante. Estos mecanismos no tendrían por qué ser excluyentes y podrían contribuir conjuntamente al incremento de la solubilidad aparente de los contaminantes orgánicos. La importancia de uno u otro dependerá de la naturaleza de la materia orgánica del suelo, los mecanismos de estabilización, la composición de los exudados radiculares (dependiente de la especie, estado fisiológico, condiciones edáficas de desarrollo,...) y el tipo de contaminante. No se encuentran referencias, sin embargo, sobre el efecto contrario, es decir, la inmovilización del contaminante orgánico inducido por los exudados radicales.

En climas templado húmedos la intensa alteración de los minerales primarios provoca una continua liberación de Fe y Al, que reaccionan con sustancias orgánicas hidrosolubles y en suspensión inmovilizándose rápidamente a partir de una determinada relación C/metal (Fernández Marcos et al., 1979, Álvarez et al., 1992). En los suelos de Galicia la formación de compuestos organoaluminicos juega un papel muy importante en la dinámica de



la materia orgánica, aumentando su estabilidad termodinámica y disminuyendo su descomposición (Carballas et al., 1978). Por tanto, es probable que la adición de exudados al suelo compleje parte de este aluminio desestabilizando la M.O. y liberando parte del HCH previamente adsorbido. Sin embargo, las diferencias encontradas entre los distintos isómeros indica que la intensidad de este efecto depende de las propiedades del isómero y del equilibrio disolución-M.O. que se establece para cada uno. Los exudados naturales no tenían influencia sobre la desorción de  $\delta$ -HCH, el isómero más soluble en agua, mientras que el efecto más acusado se obtuvo sobre  $\beta$ -HCH, el isómero más hidrofóbico. La mezcla de ácidos provocaba incluso una disminución de la solubilidad de  $\delta$ -HCH con respecto a la solubilidad en agua. Aunque lo que ocurre en estos sistemas es el efecto neto de los distintos componentes de los exudados, estos resultados apuntan a que entre estos componentes algunos de ellos contribuyen al descenso de la hidrofobicidad de  $\beta$ -HCH (también de  $\alpha$ - y  $\gamma$ -HCH) mientras que otros tienen el efecto contrario sobre  $\delta$ -HCH. Igualmente, los lugares de adsorción o los mecanismos de retención para  $\beta$ -HCH y  $\delta$ -HCH pueden ser diferentes y, por tanto, los distintos componentes de los exudados pueden estar ejerciendo un efecto diferente sobre cada uno.

### **Efecto de los AOBPM sobre la solubilidad de HCH**

Para evaluar la contribución relativa de cada componente incluido en la mezcla de los exudados artificiales sobre la solubilidad relativa de HCH, se realizó el mismo ensayo de desorción con cada compuesto orgánico por separado y a dos concentraciones diferentes, de nuevo 1 y 10 mM. Los resultados de desorción normalizados para los obtenidos con agua se recogen en la Tabla 3.3 y en la Figura 3.4. Como vemos, los resultados obtenidos presentan una gran variabilidad. El efecto de los componentes considerados sobre la solubilidad del HCH depende del compuesto, la concentración utilizada y el isómero considerados. No siempre el efecto fue positivo (aumento de desorción con respecto al agua) sino que también se han observado efectos negativos (aumento de la retención en suelo).

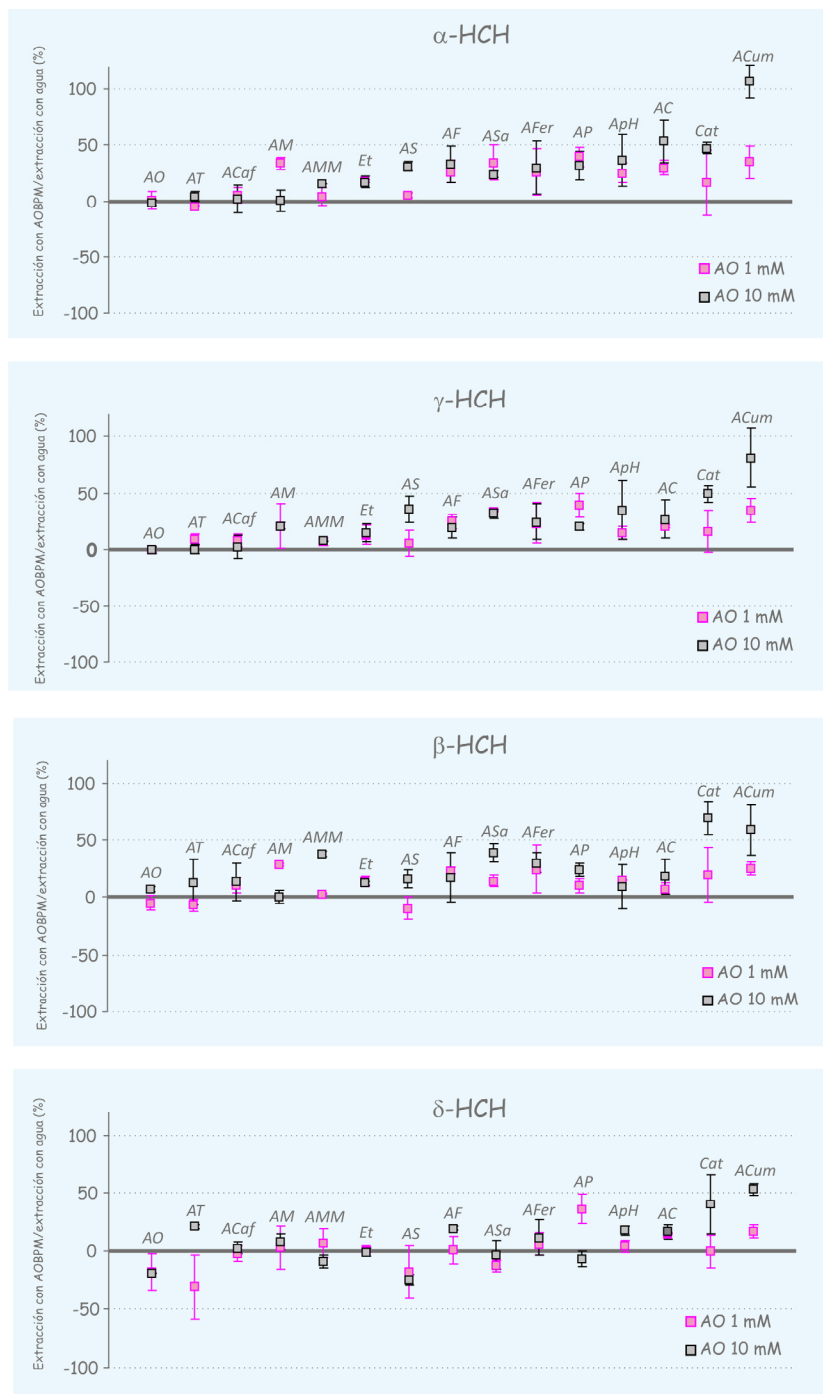
En la Tabla 3.3 se presentan los resultados obtenidos para  $\Sigma$ -HCH. Si consideramos los efectos provocados por los diferentes AOBPM utilizados en

concentración 1 mM, vemos que AO y AT no tienen efecto o disminuyen ligeramente la solubilidad conjunta de HCH, mientras que el resto de los compuestos tienen un efecto positivo, aunque la intensidad del efecto difiere para los distintos compuestos: ACaf y AS producen un aumento de la solubilidad menor o igual al 10 %; AMM, Et, ASa, AP, ApH, AC y Cat producen un aumento de solubilidad entre el 10 y el 20 % y AM, AF, AFer y ACum producen aumento de solubilidad mayor del 20 %.

**Tabla 3.3:**

Incremento de  $\Sigma$ -HCH extraído con los diferentes AOBPM por separado con respecto a la extracción con agua, expresado en porcentaje. Valores negativos indican un descenso de la solubilidad con respecto al agua.

	<b><math>\Sigma</math>-HCH extraído (%)</b>	
<b>AOBPM</b>	<b>[AOBPM] 1 mM</b>	<b>[AOBPM] 10 mM</b>
<b>AM</b>	29,6 ± 0,6	-6,2 ± 16,1
<b>AS</b>	2,9 ± 22,5	27,1 ± 6,6
<b>AC</b>	18,5 ± 5,5	30,9 ± 7,4
<b>AF</b>	24,2 ± 18,8	20,9 ± 4,7
<b>AMM</b>	10,3 ± 11,1	37,0 ± 11,6
<b>AO</b>	-3,7 ± 3,7	7,2 ± 8,9
<b>AT</b>	-8,0 ± 3,7	15,4 ± 5,9
<b>AP</b>	16,4 ± 5,5	24,6 ± 6,4
<b>ASa</b>	18,6 ± 0,6	31,9 ± 10,0
<b>Et</b>	15,0 ± 3,1	14,1 ± 3,0
<b>ApH</b>	17,9 ± 2,2	16,9 ± 9,2
<b>ACaf</b>	8,9 ± 6,7	23,1 ± 26,0
<b>ACum</b>	28,1 ± 7,8	60,7 ± 19,9
<b>AFer</b>	24,9 ± 20,1	30,0 ± 17,4
<b>Cat</b>	18,8 ± 25,4	62,4 ± 19,9

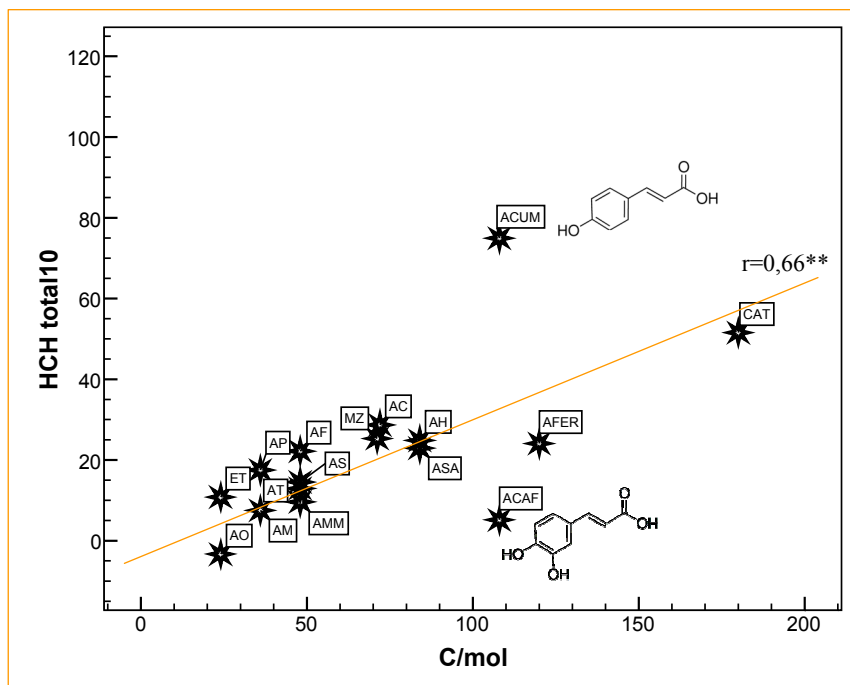


**Figura 3.4:** Porcentaje de extracción de los distintos isómeros de HCH con AOBPM por separado (concentraciones 1 y 10 mM) normalizado con la extracción en agua.

Generalmente, el incremento de concentración de los AOBPM aumentaba el efecto positivo sobre la solubilidad de  $\Sigma$ -HCH, aunque para este efecto también hay una gran variación en la intensidad y notables excepciones. Así, las diferencias entre las dos concentraciones no son significativas para Et, AF, AFer y ApH. El incremento de la solubilidad con concentración 10 mM es muy discreto para AO, ACaf, AS, AP, ASa y AC, mientras que las diferencias son más notables para AT, AMM y, sobre todo, para Cat y ACum. El AM tiene un comportamiento totalmente contrario, ya que la solubilidad relativa de  $\Sigma$ -HCH descende significativamente con el aumento de concentración. Así, la concentración 1 mM producía un aumento neto del  $29,57 \pm 0,56$  % en la solubilidad de HCH, mientras que la concentración 10 mM no tenía tanto efecto sobre la solubilidad o éste era negativo.

La solubilidad relativa de  $\Sigma$ -HCH inducida por los AOBPM en concentración 10mM correlacionaba significativamente con la cantidad de carbono por molécula de compuesto orgánico (C/mol,  $r=0.66^{**}$ ) (Figura 3.5). Esta propiedad está relacionada con el tamaño, la estructura molecular y la naturaleza de los radicales de cada compuesto (Tabla 3.1). La tendencia de esta relación indica que los AOBPM aumentaban la desorción de  $\Sigma$ -HCH en el siguiente orden: ácidos alifáticos < ácidos aromáticos < catequina. Los ácidos alifáticos carboxílicos son cadenas carbonadas con pocos átomos de carbono y muy hidrofílicos. Con la inclusión de grupos aromáticos, la cantidad relativa de carbono aumenta, al tiempo que aumenta la hidrofobicidad de las moléculas. Por último, la catequina es una molécula más grande, con dos grupos aromáticos y mayor cantidad de carbono por molécula. Dentro de cada grupo, el número de terminales hidroxílicos y su posición estructural en la molécula también generaba notables diferencias entre compuestos. Así, encontramos dos anomalías muy marcadas dentro de la tendencia general derivada de la relación de la solubilidad relativa de  $\Sigma$ -HCH y C/mol: el ácido cumárico y el cafeico. Estos dos compuestos son aromáticos, presentan la misma estructura y la única diferencia se encuentra en el número de radicales -OH (Tabla 3.1). El ACaf tiene tres radicales -OH, mientras que el ACum sólo tiene 2-OH. El tercer -OH del ACaf aumenta el número de grupos polares al tiempo que produce un efecto estérico que limita la accesibilidad del HCH al grupo aromático y, por tanto,

rebaja su solubilidad relativa. Por el contrario, el ACum, con dos radicales -OH en los extremos opuestos de una molécula relativamente grande, permite un gran acercamiento de compuestos hidrofóbicos, como el HCH, al grupo aromático, potenciando su solubilidad, a niveles incluso superiores a los conseguidos por moléculas de mayor aromaticidad, como la catequina.



**Figura 3.5:** Correlación entre el contenido de C de cada uno de los AOBPM (C/mol) y el incremento de extracción (en %) de  $\Sigma$ -HCH con los AOBPM en concentración 10 mM en relación al agua (HCH total 10).

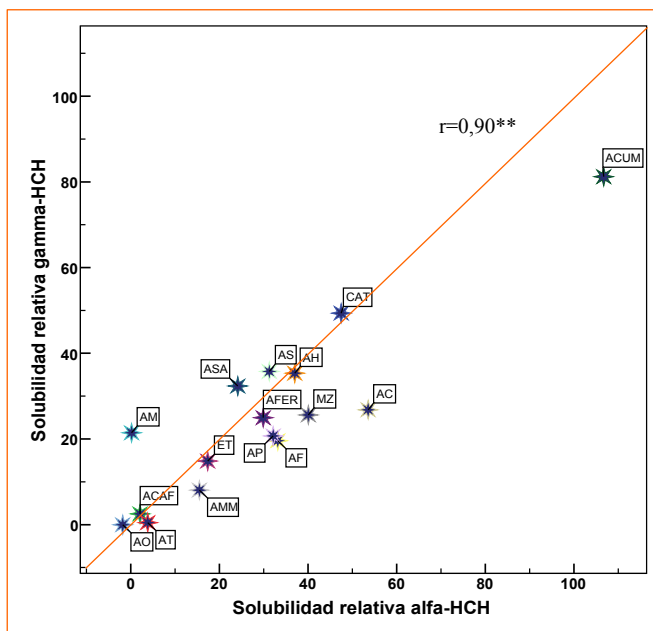
En la Figura 3.4 se presentan los resultados del efecto de cada compuesto orgánico sobre cada isómero por separado. De forma general,  $\alpha$ - y  $\gamma$ -HCH son los isómeros cuya solubilidad se ve más potenciada por los distintos compuestos considerados, mientras que  $\delta$ -HCH es el isómero para el que mayor número de compuestos no tiene efecto sobre su solubilidad y/o este efecto es negativo. Existe una correlación significativa entre los cuatro isómeros entre sí y con el  $\Sigma$ -HCH (Tabla 3.4), pero entre  $\alpha$ - y  $\gamma$ -HCH la correlación es superior a 0.9 y la recta de regresión se acerca mucho a una recta con pendiente 1 y ordenada en el origen (Figura 3.6), lo que refleja una gran similitud en su comportamiento. El ACum 10mM incrementa la solubilidad de estos dos isómeros entre un 80 y un

100% con respecto al agua, seguido de la Cat 10mM que lo hace en un 50%. Además, la mayor diferencia entre concentraciones (1 y 10mM) se ha encontrado para el ACum. (Figura 3.4 ), lo que reafirma la importancia de este compuesto en la solubilidad de  $\alpha$ - y  $\gamma$ -HCH. El ácido cumárico y catequina también son los compuestos que mayor influencia tienen sobre la solubilidad de  $\beta$ -HCH, pero en este caso es la catequina la que potencia en mayor medida este efecto, provocando un incremento medio de 75% sobre la solubilidad en agua para la concentración 10mM. Para este isómero, el mayor incremento de solubilidad inducido por el aumento de la concentración también ha sido observado para la catequina. Adicionalmente, el contenido de carbono por molécula correlaciona especialmente bien con el incremento de la solubilidad de  $\beta$ -HCH con respecto a la solubilidad en agua (Figura 3.7).

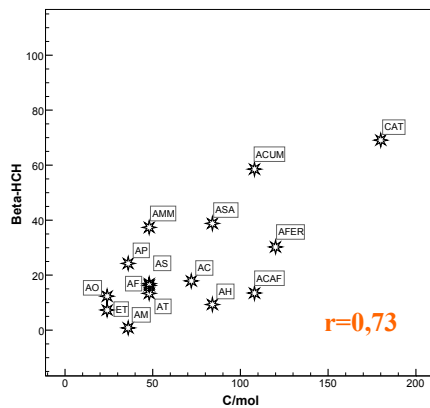
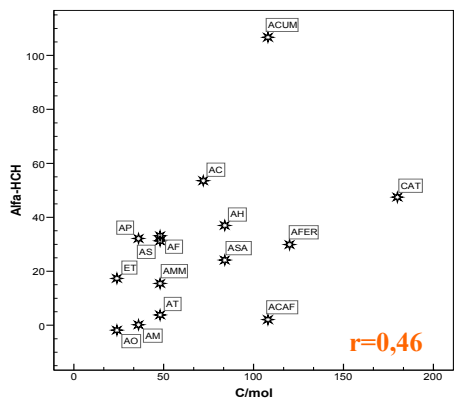
**Tabla 3.4:**

Correlaciones entre las concentraciones extraídas (%) de los distintos isómeros de HCH entre sí y con  $\Sigma$ -HCH y con el contenido de carbono por molécula de AOBPM.

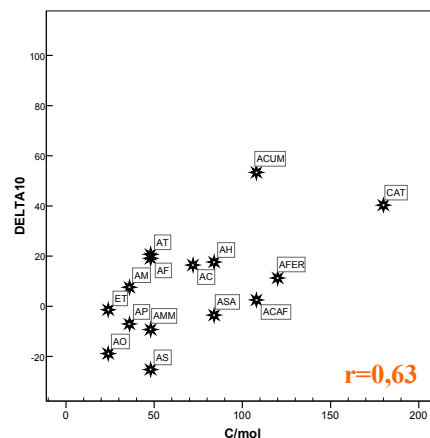
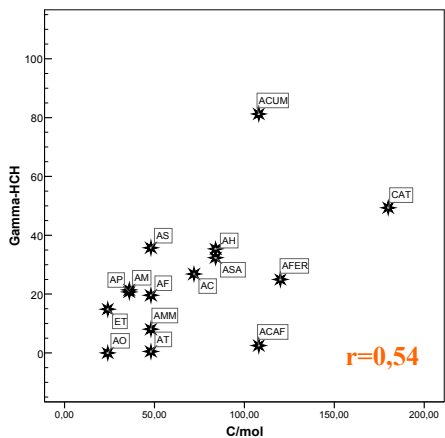
		[AOBPM] 1 mM					[AOBPM] 10 mM					Kg C/mol AOBPM
		$\alpha$ -HCH	$\gamma$ -HCH	$\beta$ -HCH	$\delta$ -HCH	$\Sigma$ -HCH	$\alpha$ -HCH	$\gamma$ -HCH	$\beta$ -HCH	$\delta$ -HCH	$\Sigma$ -HCH	
[AOBPM] 1 mM	$\alpha$ -HCH	1	<b>0,895**</b>	0,710**	0,716**	0,955**	0,479	0,534*	0,193	0,319	0,447	0,134
	$\gamma$ -HCH		1	0,550**	0,649**	0,886**	0,482	0,501*	0,347	0,364	0,490	0,184
	$\beta$ -HCH			1	0,488*	0,778**	0,375	0,478	0,300	0,591*	0,495	0,417
	$\delta$ -HCH				1	0,845**	0,464	0,347	0,238	0,230	0,379	0,106
	$\Sigma$ -HCH					1	0,518*	0,525*	0,302	0,413	0,511*	0,277
[AOBPM] 10 mM	$\alpha$ -HCH						1	<b>0,902**</b>	0,650**	0,668**	<b>0,938**</b>	0,458
	$\gamma$ -HCH							1	0,674**	0,629**	0,925**	0,539*
	$\beta$ -HCH								1	<b>0,550*</b>	0,807**	<b>0,728**</b>
	$\delta$ -HCH									1	0,811**	<b>0,628*</b>
	$\Sigma$ -HCH										1	<b>0,656**</b>
	C/mol											1



**Figura 3.6:**  
Correlación entre la cantidad de  $\alpha$ -HCH y  $\gamma$ -HCH extraídas con los AOBPM en concentración 10 mM



**Figura 3.7:**  
Correlación entre el contenido de C de cada uno de los AOBPM y la extracción (en %, normalizada con la extracción en agua) de cada uno de los isómeros de HCH.



## Conclusiones

1. Los exudados radiculares de *Holcus lanatus* ejercen un efecto positivo sobre la movilidad del HCH, aumentando la solubilidad de  $\Sigma$ -HCH con respecto al agua en un 25%. Este efecto es más importante para el isómero  $\beta$ -HCH, seguido de  $\alpha$ - y  $\gamma$ -HCH y prácticamente inapreciable para el  $\delta$ -HCH.
2. Los exudados radiculares artificiales ejercen también un efecto positivo sobre la movilidad del HCH siendo este efecto mayor con la mezcla de concentración 10 mM. El aumento de la solubilidad en este caso es mayor para el  $\alpha$ -HCH (40,1 % de aumento de solubilidad respecto a la solubilidad en agua) seguido de los isómeros  $\beta$ - y  $\gamma$ -HCH (25, 9 y 25,6 %, respectivamente) y mucho menor para el  $\delta$ -HCH (9,6%).
3. El efecto que los AOBPM ejercen por separado sobre la movilidad del HCH es muy variable, en general este efecto aumenta con la concentración del ácido, aunque también se observaron casos en los que el aumento no produjo efecto o incluso el efecto se invertía.
4. En general el aumento de movilidad impulsado por los compuestos fenólicos es mayor que el de los ácidos alifáticos (aunque el ácido salicílico es uno de los compuestos que ejerce menor efecto). Siendo el ácido cumárico en concentración 10 mM, para  $\alpha$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH y la catequina para  $\beta$ -HCH los que aumentan más la solubilidad respecto a la extracción con agua en este sistema.
5. La elevada correlación entre los resultados obtenidos entre los isómeros alfa y gamma indica un comportamiento similar de ambos isómeros mientras que beta parece comportarse de forma diferente frente a los mismos ácidos y en las mismas condiciones. El isómero delta presenta



un comportamiento parecido al de alfa y gamma, pero el efecto de los exudados y sus componentes sobre su solubilidad es mucho menor.

6. La elevada correlación entre la cantidad de carbono presente en los AOBPM y la cantidad de HCH extraída indican una fuerte influencia del carbono orgánico en la movilidad de los isómeros de HCH, aumentando la movilidad con el aumento en disolución de carbono orgánico perteneciente a los AOBPM.
7. No se puede dar una explicación completa del papel de los exudados de la raíz sobre la movilización de los isómeros de HCH pero su influencia es evidente. Ya que la composición de los exudados varía entre especies vegetales y condiciones edáficas de crecimiento, sería necesario realizar estudios de detalle que permitan seleccionar las combinaciones óptimas de especie-manejo del suelo para maximizar el aumento de la biodisponibilidad del HCH, lo que favorecería la velocidad de su mineralización.
8. Finalmente, los resultados de este estudio permiten plantear la posibilidad de utilizar compuestos de los exudados vegetales como enmienda del suelo para potenciar los procesos de fitocorrección de contaminantes hidrofóbicos.

## Referencias

- Alexander, M. 2000. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 34:4259-4265.
- Álvarez, E., A. Martínez and R. Calvo de Anta. 1992. Geochemical aspects of aluminium in forest soils in Galicia (NW Spain). *Biogeochemistry*. 16: 167-180.
- Breivik, K., J.M. Pacyna and J. Münch. 1999. Use of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane in Europe, 1970-1996. *Sci. Total Environ.* 239:151-163.
- Calvelo Pereira, R., M. Camps-Arbestain, B. Rodriguez Garrido, F. Macias and C. Monterroso. 2006. Behaviour of alpha -, beta -, gamma -, and delta - hexachlorocyclohexane in the soil-plant system of a contaminated site. *Environ. Pollut.* 144:210-217.
- Campanella, B. and R. Paul. 2000. Presence, in the rhizosphere and leaf extracts of zucchini (*cucurbita pepo L.*) and melon (*cucumis melo L.*) of molecules capable of increasing the apparent aqueous solubility of hydrophobic pollutants. *Int. J. Phytoremediation*. 2:145-158.
- Carballas, T., M. Carballas and F. Jacquin. 1978. Biodegradation et humification de la matiere organique des sols humifères atlantiques. *An. Edaf. Agrob.* 37:205-212.
- Chen, Y.X., Q. Lin, Y.M. Luo, Y.F. He, S.J. Zhen, Y.L. Yu, G.M. Tian and M.H. Wong. 2003. The role of citric acid on the phytoremediation of heavy metal contaminated soil. *Chemosphere* 50:807-811.
- Cunningham, S.D., T.A. Anderson, A.P. Schwab and F.C. Hsu. 1996. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. p. 55-114. In Donald L. Sparks (ed.) *Advances in agronomy*, Academic Press.

- Eptisa, 1999. Investigación de los suelos contaminados en el emplazamiento de Torneiros -Concello de O Porriño- (Pontevedra). Informe técnico.
- Fernández Marcos, M.L., F. Macías and F. Guitián. 1979. A contribution to the study of the stability of the clay minerals from the soil solution composition at different pF values. *Clay minerals*. 14:29-37
- Flores-Cespedes, F., E. Gonzalez-Pradas, M. Fernandez-Perez, M. Villafranca-Sanchez, M. Socias-Viciano and M.D. Urena-Amate. 2002. Effects of dissolved organic carbon on sorption and mobility of imidacloprid in soil. *J. Environ. Qual.* 31:880-888.
- Gee, G.W. and J.W. Bauder. 1986. Particle-size analysis. p. 383-412. In A. Kute (ed.) *Methods of soil analysis. Part 1* 2nd ed. Agron. Monogr. 9 ASA and SSSA, Madison, Wisconsin.
- Hinsinger, P., C. Plassard and B. Jaillard. 2006. Rhizosphere: A new frontier for soil biogeochemistry. *J. Geochem. Explor.* 88:210-213.
- Hinsinger, P., G.R. Gobran, P.J. Gregory and W.W. Wenzel. 2005. Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytol.* 168:293-303.
- Hsu, T.S. and R. Bartha. 1979. Accelerated mineralization of two organophosphate insecticides in the rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 37:36-41.
- Hülster, A., J.F. Müller and H. Marschner. 1994. Soil-plant transfer of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans to vegetables of the cucumber family (cucurbitaceae). *Environ. Sci. Technol.* 28:1110-1115.
- Jones, D.L., P.G. Dennis, A.G. Owen and P.A.W. van Hees. 2003. Organic acid behavior in soils - misconceptions and knowledge gaps. *Plant Soil.* 248:31-41.
- Jones, D.L. 1998. Organic acids in the rhizosphere - a critical review. *Plant Soil.* 205:25-44.

- Kidd, P.S., A. Prieto-Fernandez, C. Monterroso and M.J. Acea. 2008. Rhizosphere microbial community and hexachlorocyclohexane degradative potential in contrasting plant species. *Plant Soil*. 302:233-247.
- Kpombrekou-A, K. and M.A. Tabatabai. 2003. Effect of low-molecular weight organic acids on phosphorus release and phytoavailability of phosphorus in phosphate rocks added to soils. *Agric. Ecosyst. Environ.* 100:275-284.
- Krishnamurti, G.S.R., G. Cieslinski, P.M. Huang and K.C.J. Van Rees. 1997. Kinetics of cadmium release from soils as influenced by organic acids: Implication in cadmium availability. *J. Environ. Qual.* 26:271-277.
- Lee, J., R.D. Reeves, R.R. Brooks and T. Jaffré. 1977. Isolation and identification of a citrato-complex of nickel from nickel-accumulating plants. *Phytochemistry*. 16:1503-1505.
- Li, K., B. Xing and W.A. Torello. 2005. Effect of organic fertilizers derived dissolved organic matter on pesticide sorption and leaching. *Environ. Pollut.* 134:187-194.
- Mench, M. and E. Martin. 1991. Mobilization of cadmium and other metals from two soils by root exudates of *zea mays L.*, *nicotiana tabacum L.* and *nicotiana rustica L.* *Plant Soil*. 132:187-196.
- Mench, M., J.L. Morel, A. Guckert and B. Guillet. 1988. Metal binding with root exudates of low molecular weight. *J. Soil Sci.* 39:521-527.
- Miya, R.K. and M.K. Firestone. 2001. Enhanced phenanthrene biodegradation in soil by slender oat root exudates and root debris. *J. Environ. Qual.* 30:1911-1918.
- Nardi, S., G. Concheri, D. Pizzeghello, A. Sturaro, R. Rella and G. Parvoli. 2000. Soil organic matter mobilization by root exudates. *Chemosphere*. 41:653-658.
- Peech, M., L.T.Alexander, L.A. Dean and J.F.Reed. 1947. Methods of soil analysis for soil fertility investigations. U.S.D.A. Cir. 757.

- Ryan, P.R., E. Delhaize and D.L. Jones. 2001. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52:527-560.
- Salt, D. E., R.D. Smith and I. Raskin. 1998. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 49: 643-668.
- Schnoor, J.L., L.A. Light, S.C. McCutcheon, N.L. Wolfe and L.H. Carreira. 1995. Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 29:318A-23A.
- Schwitzguebel, J., J. Meyer and P. Kidd. 2006. Pesticides removal using plants: Phytodegradation versus phytostimulation. p. 179-198. In M. Mackova, D.N. Dowling and T. Macek (eds.) *Phytoremediation and rhizoremediation. Theoretical Background*, vol 9A. Springer, The Netherlands.
- Semple, K.T., A.W.J. Morriss and G.I. Paton. 2003. Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: Fundamental concepts and techniques for analysis. *Eur. J. Soil Sci.* 54:809-818.
- Stevenson, F.J. 1967. Organic acids in soil. *Soil Biochemistry.* 119-146.
- Strobel, B.W. 2001. Influence of vegetation on low-molecular-weight carboxylic acids in soil solution. A review. *Geoderma.* 99:169-198.
- Tan, K.H. 1994. Organic constituents. p. 51-95. In *Environmental soil science*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Wania, F. and D. Mackay. 1996. Tracking the distribution of persistent organic pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 30:390A-396A.
- Wasay, S.A., S. Barrington and S. Tokunaga. 2001. Organic acids for the in situ remediation of soils polluted by heavy metals: Soil flushing in columns. *Water Air Soil Pollut.* 127:301-314.

- White, J.C. 2000. Phytoremediation of weathered p,p'-DDE residues in soil. Int. J. Phytorem. 2:133-144.
- White, J.C. and B.D. Kottler. 2002. Citrate-mediated increase in the uptake of weathered 2,2-bis(p-chlorophenyl)1,1-dichloroethylene residues by plants. Environ. Toxicol. Chem. 21:550-556.
- White, J.C., M.I. Mattina, W. Lee, B.D. Eitzer and W. Iannucci-Berger. 2003. Role of organic acids in enhancing the desorption and uptake of weathered p,p'-DDE by *cucurbita pepo*. Environ. Pollut. 124:71-80.
- Yang, Y., D. Ratte, B.F. Smets, J.J. Pignatello and D. Grasso. 2001. Mobilization of soil organic matter by complexing agents and implications for polycyclic aromatic hydrocarbon desorption. Chemosphere. 43:1013-1021.



## Capítulo 4

*Deshalogenación reductiva  
de  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH en  
medio acuoso*



Publicado en:

M. Camps Arbestain., B. Rodríguez-Garrido, C. Monterroso and F. Macías. 2003. **Reductive dechlorination of alpha, beta, and gamma-hexachlorocyclohexane in the presence of dithiotreitol as a reducing agent** (Poster). International workshop on bioavailability of soil pollutants and risk assessment, Monteverita, Ticino, Suiza.

B. Rodríguez-Garrido, M. Camps Arbestain, M.C. Monterroso and F. Macías. 2003. Reductive **Dechlorination of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -Hexachlorocyclohexane by Hydroxocobalamin in Presence of Ti(III) Citrate.** (Poster). COST Action 837, Achievements and Prospects of Phytoremediation in Europe. Final Workshop and Management Committee Meeting, Viena-Austria.

B. Rodríguez-Garrido, M. Camps Arbestain, M.C. Monterroso and F. Macías. 2004. **Reductive Dechlorination of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -, and  $\gamma$ -Hexachlorocyclohexane Isomers by Hydroxocobalamin in the Presence of either Dithiothreitol or Ti(III) Citrate as Reducing Agents.** Environmental Science and Technology. 38:5046-5052. 2004.

## Resumen

El potencial reductor afecta a la deshalogenación reductiva de los diferentes isómeros de hexaclorociclohexano (HCH), pero este efecto todavía no ha sido estudiado. En este trabajo se estudió la capacidad de la hidroxocobalamina (vitamina B<sub>12a</sub>) para catalizar la degradación de  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, y  $\delta$ -HCH en presencia de dos reductores diferentes: ditioneitol (DTT) y citrato de Ti(III) (con potenciales de reducción a pH 7 de: -0,33 y -0,48 V, respectivamente). Para ello se realizaron ensayos de degradación, de una hora de duración, en medio acuoso tamponado. En ausencia del catalizador (hidroxocobalamina), no se observó disminución en la concentración de ninguno de los isómeros de HCH usando DTT como agente reductor; sin embargo, desapareció el 62,9% de  $\gamma$ -HCH y el 16,6% de  $\alpha$ -HCH al usar citrato de Ti(III) como agente reductor. La adición de hidroxocobalamina al sistema con DTT favoreció la degradación de  $\gamma$ - y  $\alpha$ -HCH (92,9 y 30,8% de desaparición), en menor medida la de  $\delta$ -HCH (11,9%) y fue casi inapreciable la de  $\beta$ -HCH. La presencia de hidroxocobalamina en el sistema con citrato de Ti(III) favoreció la degradación de todos los isómeros de HCH estudiados: las concentraciones de  $\gamma$ - y  $\alpha$ -HCH disminuyeron hasta niveles indetectables (<0,1%) después de 1 y 2 minutos, respectivamente; mientras que la disminución de  $\delta$ -HCH y  $\beta$ -HCH fue del 99,9 y 99,6% después de 10 y 60 minutos, respectivamente. La velocidad de degradación de los isómeros de HCH ( $\gamma$ -HCH >  $\alpha$ -HCH >  $\delta$ -HCH >  $\beta$ -HCH) disminuía en el mismo orden que el número de átomos de cloro en posición axial ( $3 > 2 > 1 > 0$ ), siendo, por tanto, la estructura termodinámicamente más estable aquella en la que hay menor número de cloros axiales.

Este trabajo es el primero en describir una degradación rápida de los isómeros  $\delta$ - y  $\beta$ -HCH bajo condiciones abióticas, y los resultados demuestran el efecto del potencial redox sobre la deshalogenación reductiva de los isómeros de HCH.

### Introducción

El gamma-hexaclorociclohexano ( $\gamma$ -HCH o lindano) es un insecticida orgánico halogenado que se ha usado desde los años 40 (Li et al., 1998). Durante el proceso de producción de  $\gamma$ -HCH se obtiene una mezcla de los diferentes isómeros de HCH conocida como HCH de grado técnico, que contiene: 55-80%  $\alpha$ -HCH, 5-14%  $\beta$ -HCH, 8-15%  $\gamma$ -HCH y 2-16%  $\delta$ -HCH (Breivik et al., 1999). El HCH de grado técnico se usó como insecticida en la mayoría de los países industrializados hasta finales de los años 70 y en la actualidad sólo sigue en uso el  $\gamma$ -HCH (Breivik et al., 1999; Walker et al., 1999). Durante muchos años los isómeros de HCH que carecen de propiedades insecticidas fueron separados del  $\gamma$ -HCH y vertidos en lugares cercanos a los centros de producción, provocando contaminación de suelos y aguas subterráneas en muchos países (Doelman et al., 1985). A pesar de la disminución del uso de HCH en muchos países (Breivik et al., 1999) todavía sigue habiendo problemas medioambientales debido a la alta persistencia de estos residuos.

Numerosos estudios mostraron la degradación del HCH, pero este proceso era diferente según las condiciones de degradación y variaba para los distintos isómeros (Jagnow et al., 1977; Bachmann et al., 1988; Buser and Müller, 1995). En condiciones bióticas se podrían distinguir 3 rutas degradativas distintas:

1. **degradación oxidativa**, llevada a cabo por bacterias aeróbicas que usan estos compuestos como fuente de carbono y energía. Esta ruta degradativa comienza con la formación de pentaclorociclohexeno (PCCCH) por deshidrohalogenación (Sahu et al., 1995; Johri et al., 1998; Nagata et al., 1999).
2. **degradación reductiva**, llevada a cabo por bacterias anaeróbicas, generalmente bacterias metanogénicas y acetogénicas. La reacción comienza con dos dihaloeliminaciones con formación de tetraclorociclohexeno (TeCCCH), seguido de diclorociclohexadieno (DCCH) y, finalmente, una deshidrohalogenación para formar

clorobenzeno (CB) como producto final (Jagnow et al., 1977; Kuhn and Suflita, 1989; Middeldorp et al., 1996; van Eekert et al., 1998).

3. **degradación con un paso reductivo inicial** (donde probablemente está implicado el NADH) que da lugar a la formación de TeCCH, **seguido de varias reacciones de oxidación**. Esta degradación es llevada a cabo por microorganismos anaeróbicos, como bacterias (Matsumura et al., 1976) u hongos (Mougin et al., 1996).

En condiciones abióticas Liu et al. (2003) indicaron que la degradación de los isómeros de HCH dependía del pH y del Eh. Estos autores describieron una ruta de deshidrohalogenación para  $\gamma$ -HCH a pH 6,7 que implicaba una hidrólisis en la que se formaba PCCH como producto intermedio. La velocidad de esta reacción aumentaba en un orden de magnitud por unidad de pH entre pH 6,7 y pH 12,0. Además, otros autores también observaron dihaloeliminación de  $\gamma$ -HCH en presencia de agentes reductores, con (Marks et al., 1989) o sin (Liu et al., 2003) catalizador (por ejemplo metalocoenzimas).

Buser y Müller (1995) estudiaron la degradación abiótica en condiciones anaerobias de los isómeros  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ - y  $\gamma$ -HCH en lodos esterilizados, pero desafortunadamente no detectaron ningún producto de degradación. Las velocidades de degradación que observaron eran muy diferentes entre los distintos isómeros ( $\gamma > \alpha > \delta > \beta$ ) y los autores atribuyeron la degradación, además de a los reductores, a la presencia de catalizadores.

La deshalogenación reductiva catalizada por metalocoenzimas es una alternativa muy interesante para el tratamiento de residuos y para la descontaminación de suelos y aguas (Lewis et al., 1996; Morra et al., 2000). Los sistemas empleados para este proceso incluyen el uso de un tampón, un catalizador y un reductor que, además de ser la fuente de electrones, controla el mecanismo de la reacción (Chiu and Reinhard, 1995; Chiu and Reinhard, 1996). Marks et al. (1989) consiguieron la deshalogenación de  $\gamma$ -HCH en sistemas abióticos, utilizando ditiotreitól (DTT) como fuente de electrones y corrinas con Co (cianocobalamina, hidroxocobalamina, cobinamida dicianida). El DTT reduce el metal de la corrina de Co(III) a Co(II), pero el uso de reductores más potentes, como el citrato de Ti(III), podrían conseguir su reducción a Co (I) y

aumentar la eficacia catalítica de la corrina en la reacción de deshalogenación de HCH.

El objetivo de este estudio es comparar las reacciones de deshalogenación reductiva de  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH en presencia de hidroxocobalamina (vitamina B<sub>12a</sub>) usando DTT o citrato de Ti(III) como agente reductor.

## Material y métodos

### Reactivos utilizados

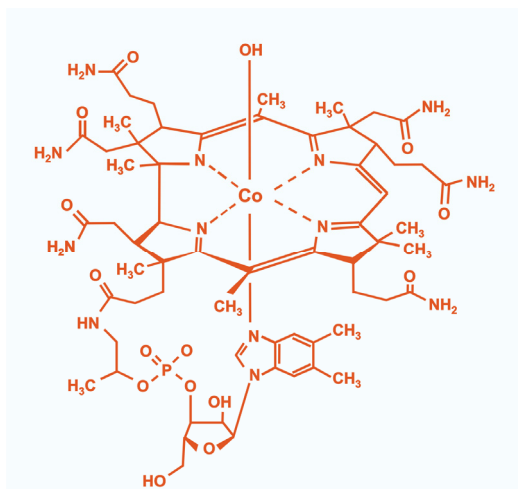
Los isómeros  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\delta$ - HCH (pureza 98,7, 98,1 y 98,6% respectivamente) y el cloruro de titanio (III) (pureza 15%, en disolución de ácido clorhídrico) proceden de Riedel-de-Haën AG (Seelze, Alemania); el isómero  $\gamma$ -HCH (99% de pureza), DTT (HSCH<sub>2</sub>-CHOH-CHOH-CH<sub>2</sub>SH) (98% de pureza), ácido cítrico anhidro (99,5% de pureza) y el tampón tris (2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol) (99% de pureza) proceden de Sigma (St. Louis, MO); la vitamina B<sub>12a</sub> (hidroxocobalamina, 96% de pureza) procede de Fluka Chemical Corp. (Ronkonkoma, NY).

Se prepararon por separado disoluciones patrón de los distintos isómeros de HCH ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH) de concentración 1,72 mM (500 mg L<sup>-1</sup>) en acetona y se guardaron a 4 °C hasta su utilización. Se purgó agua ultrapura (Milli-Q) con N<sub>2</sub> durante 1 h y se guardó inmediatamente en atmósfera de N<sub>2</sub> en la cámara de atmósfera controlada (modelo SL 34790, Cole Parmer, Vernon Hills, IL), con el resto del material, se mantuvo en estas condiciones 24 h antes de su utilización para la preparación de las disoluciones de reacción. Además, se preparó una disolución de citrato de Ti(III) 10 mM en la cámara de atmósfera controlada a partir de una disolución de TiCl<sub>3</sub> (15%) y ácido cítrico, con una relación final citrato/Ti(III) 2:1. Todas las disoluciones se prepararon a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).

## Reducción de la vitamina B<sub>12a</sub>

Las Cobalaminas son tetrapirroles en los cuales el Co(III) está rodeado por un anillo de corrina (Kliwer and Morra, 1998) (Figura 4.1). La molécula de hidroxocob(III)alamina (B<sub>12a</sub>) tiene un grupo benzimidazol coordinado en la posición  $\alpha$  axial y un grupo OH<sup>-</sup> en la posición  $\beta$  axial. El término B<sub>12a</sub> se refería históricamente a la aquocob(III)alamina (H<sub>2</sub>O en la posición  $\beta$ ) pero en disolución acuosa básica con un pH mayor de 7,8, como la que usamos en este estudio, el agua se desprotona fácilmente y la hidroxocob(III)alamina es la forma principal (Lexa and Saveant, 1983; Giorgetti et al., 2000). Para que la cobalamina pueda producir la deshalogenación reductiva de los isómeros de HCH su centro metálico (el cobalto) debe estar en su forma reducida.

**Figura 4.1:**  
Estructura de la  
hidroxocobalamina



Para verificar el estado de oxidación del centro metálico de la vitamina B<sub>12a</sub> se preparó, en una cámara de atmósfera controlada, una mezcla acuosa que contenía: tampón tris-HCl 100 mM (tampón tris ajustado con HCl a pH 8,9), DTT 514 mM y vitamina B<sub>12a</sub> 75  $\mu$ M. La relación molar de DTT:hidroxocobalamina fue 6850 mol/mol, la misma que se usó en el estudio cinético, pero las concentraciones se aumentaron para poder hacer las medidas espectrofotométricas. Se añadió un mililitro de disolución a la cubeta de cuarzo en atmósfera de N<sub>2</sub>, luego se tapó la cubeta y se sacó de la cámara. Se registró el espectro UV-Vis a diferentes intervalos de tiempo con un espectrofotómetro Jasco V-530 (Jasco Corporation, Tokyo, Japon) a temperatura ambiente.

De la misma forma se preparó una mezcla acuosa de 20 ml que contenía tampón tris-HCl 100 mM, citrato de Ti(III) 1 mM y vitamina B<sub>12a</sub> 50  $\mu$ M, y se realizaron las medidas espectrofotométricas. La relación molar Ti(III):hidroxocobalamina fue menor que la usada en el estudio cinético

(relación 20 mol/mol comparado con 6850 mol/mol en el caso del DTT) para poder realizar las medidas espectrofotométricas. Se añadió un mililitro de esta disolución a la cubeta de cuarzo en atmósfera de  $N_2$ , después de cerrar la cubeta se sacó de la cámara y se registraron los espectros a diferentes intervalos de tiempo a temperatura ambiente. Se registró otro espectro bajo condiciones aerobias y sin adicionar los reductores.

### Ensayo cinético de degradación de HCH

Los experimentos se llevaron a cabo usando viales de 25 mL tapados con septum de Teflón (Supelco, Bellefonte, PA) y sellados con una tapa de aluminio. Todos los experimentos se realizaron cubriendo los viales con papel de aluminio para evitar la ruptura de los enlaces Co-C de la hidroxocobalamina por la exposición a la luz. En cada vial se preparó la mezcla reactiva que contenía: tampón tris-HCl 100 mM y DTT o citrato de Ti(III) 5 mM. A esta mezcla se añadió 200  $\mu$ L de cob(III)alamina 73  $\mu$ M disuelta en tampón tris-HCl 100 mM, después de sellar los viales se sacaron de la cámara de atmósfera controlada y se añadieron 400  $\mu$ L del isómero de HCH objeto de estudio (de concentración 1719  $\mu$ M en acetona). El volumen final fue siempre de 20 ml y la concentración final de HCH fue de 34,4  $\mu$ M (10 mg  $L^{-1}$ ). El hecho de que los isómeros estuvieran disueltos en acetona antes de añadirlos a la mezcla reactiva facilitó su solubilización. Los experimentos se realizaron por duplicado. Los viales se incubaron durante una hora a 37°C en la oscuridad. Se tomaron muestras (25  $\mu$ L) de cada vial a diferentes intervalos de tiempo (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 minutos). De la misma forma se prepararon y se tomaron muestras a los mismos intervalos de tiempo de otras mezclas reactivas (i) unas en las que estaba ausente la hidroxocobalamina y el reductor y (ii) otras con reductor pero sin hidroxocobalamina. Además, para la identificación de los productos de degradación, se realizó un experimento idéntico en el que se tomaron 4 ml de muestra de la mezcla reactiva (después de 20 minutos para el sistema DTT + hidroxocobalamina; después de 0, 20 y 45 minutos para el sistema con citrato de Ti(III) y después de 0, 1, 2, 5, 20 y 45 minutos para el sistema que contenía citrato de Ti(III) + hidroxocobalamina).

### **Preparación de la muestra y métodos analíticos**

La concentración de los isómeros de HCH se determinó en fase líquida después de la extracción de 25  $\mu\text{L}$  de muestra con 5 mL de hexano. La mezcla de extracción se dejó en un baño de ultrasonidos durante 20 minutos y después se secó la fase orgánica con sulfato sódico anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Los extractos se analizaron sin concentrar utilizando un cromatógrafo de gases (modelo GC 8532 Mega 2 series, Fisons Instruments, Milán, Italia), equipado con un ECD (detector de captura electrónica, modelo ECD 850, Thermo Quest, Milán, Italia) y un muestreador automático (modelo AS 800, Fisons Instruments, Milán, Italia). Se trabajó con un inyector de split/splitless en modo splitless y el volumen de inyección fue de 1  $\mu\text{L}$ . Para la separación se usó una columna capilar Rtx®-ClPesticides (Restek Corporation, E.E.U.U. Bellefonte, PA) de 0,25 mm  $\times$  30 m. Como gas portador se empleó helio, con una presión de 115 KPa y como gas auxiliar del detector  $\text{N}_2$ , con una presión de 105 KPa. La temperatura del inyector fue de 270  $^{\circ}\text{C}$  y la del detector de 300  $^{\circ}\text{C}$ . Se trabajó en condiciones de gradiente de temperatura, cuyo programa utilizado fue: 60  $^{\circ}\text{C}$  (1 min), una rampa de temperatura de 30  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  hasta alcanzar los 180  $^{\circ}\text{C}$ , luego con una rampa de 6  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  hasta 230  $^{\circ}\text{C}$  y finalmente con una rampa de 30  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , hasta 270  $^{\circ}\text{C}$  (4 min), al terminar la temperatura se redujo de nuevo a 60  $^{\circ}\text{C}$ .

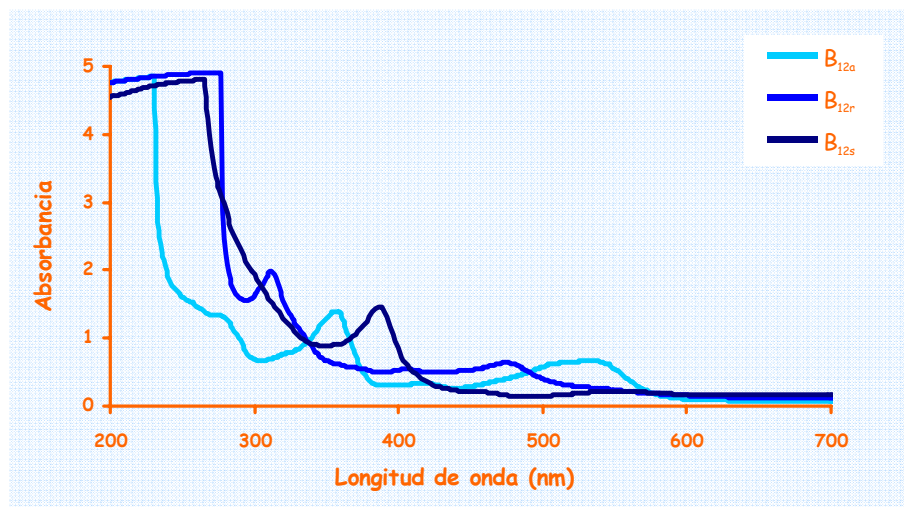
Para la identificación de los productos de degradación (PCCH, TeCCH y CB), se extrajeron 4 mL de muestra tomados a los intervalos de tiempo ya indicados con 4 mL de hexano. Las mezclas de extracción se dejaron en un baño de ultrasonidos durante 20 minutos y luego se secó el extracto en hexano con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. Los extractos se analizaron sin concentrar con un cromatógrafo de gases (modelo 3400, Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) equipado un detector de espectrometría de masas de trampa iónica (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). Se trabajó con un inyector de split/splitless en modo splitless y el volumen de inyección fue de 1  $\mu\text{L}$ . Para la separación usamos una columna capilar (CP-Sil 8 CB Low Bleed/MS) de 0,25 mm  $\times$  30 m. Se usó helio como gas portador (80 KPa). El programa de temperatura del horno del GC/MS comenzó a 35  $^{\circ}\text{C}$  (6 min), aumentó a 3  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  hasta los 100  $^{\circ}\text{C}$  y después aumentó a 8  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  hasta 270  $^{\circ}\text{C}$ . Las temperaturas de la interfase y de la fuente de iones fueron de 280 y 220  $^{\circ}\text{C}$ , respectivamente y la energía de ionización fue de 70 eV.



## Resultados y discusión

### Reacción de reducción de la hidroxocobalamina

En el caso del DTT, dado su potencial redox (-0,33 V, pH 7), puede reducirse el Co(III) de la hidroxocobalamina ( $B_{12a}$ ), con número de coordinación seis, a Co(II) pentacoordinado ( $B_{12r}$ ) (Reinhard et al., 1999). En este proceso puede perderse el ligando axial  $\alpha$  o el  $\beta$ , dependiendo del pH del sistema: si el pH es mayor de 2,9 (como en el sistema que se estudió) se pierde el ligando axial  $\beta$ , a pH menores se pierde el ligando axial  $\alpha$  (Giorgetti et al., 2000). En el caso del Ti(III), con un potencial redox de -0,48 V (a pH 7), a pH mayor de 7,3, el Co(III) hexacoordinado se reduce a Co(I) tetracoordinado ( $B_{12s}$ ) (Chiu and Reinhard, 1995), y se pierden los dos ligandos axiales (Lexa and Saveant, 1983). En el presente estudio el estado de oxidación de la cobalamina a lo largo del tiempo, después de la adición de reductor (DTT o citrato de Ti(III)) o en ausencia de reductor fue analizado por espectrofotometría UV/Vis obteniéndose los espectros recogidos en la Figura 4.2. Estos espectros coinciden ; totalmente con los publicados por Glod et al. (1997).



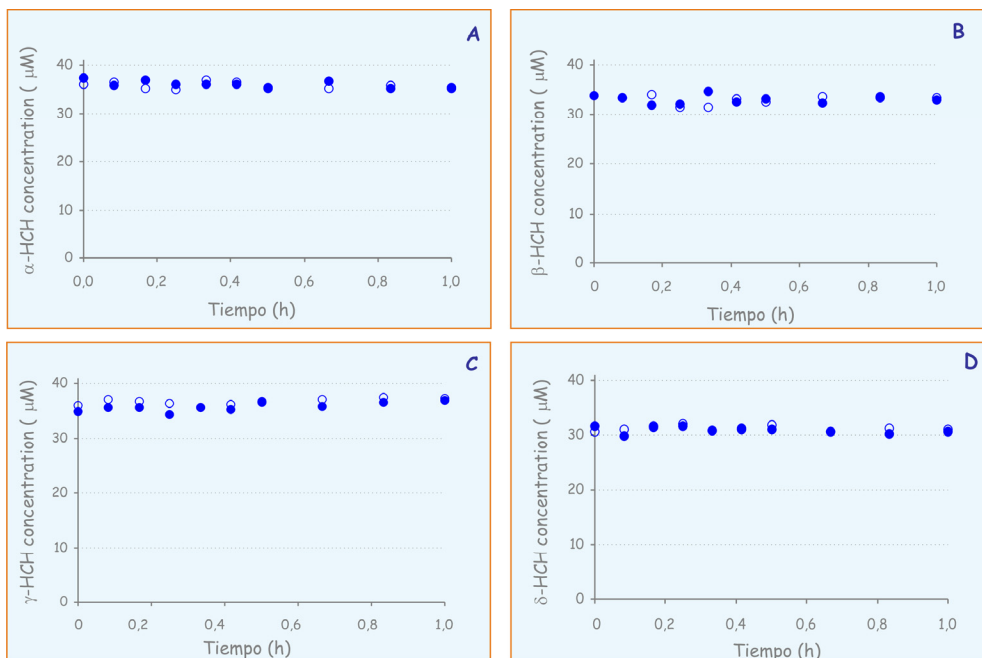
**Figura 4.2:**  
Espectros de la  $B_{12a}$ ,  
 $B_{12r}$  y  $B_{12s}$ .

El espectro de la Vitamina B<sub>12a</sub> (Co III) obtenido presentaba las absorbancias caracteísticas a 278, 356 (típicamente intensas) y a 534 nm; por su parte, el espectro de la vitamina B<sub>12r</sub> (Co II) mostró máximos de absorbancias a 311 (típicamente intensa), 405 y 473 nm; el espectro correspondiente a la vitamina B<sub>12s</sub> (Co I) mostró un pico alto a 386 nm (Figura 4.2). La reducción de B<sub>12a</sub> a B<sub>12r</sub> con DTT y de B<sub>12a</sub> a B<sub>12s</sub> con citrato de Ti(III) fue muy rápida, confirmándose una reducción del 100 % tras 2 minutos de reacción en las condiciones experimentales empleadas (relación molar DTT:hidroxocobalamina de 6850; citrato de Ti(III):hidroxocobalamina de 20; pH 8,9), estos resultados están de acuerdo con lo señalado por otros autores (Chiu and Reinhard, 1995; Assaf-Anid et al., 1994). Nuestros resultados indican que la reducción de vitamina B<sub>12a</sub> a B<sub>12r</sub> (en presencia de DTT) y de vitamina B<sub>12a</sub> a B<sub>12s</sub> (en presencia de citrato de Ti(III)) probablemente no limita la velocidad de las reacciones de deshalogenación de los isómeros de HCH.

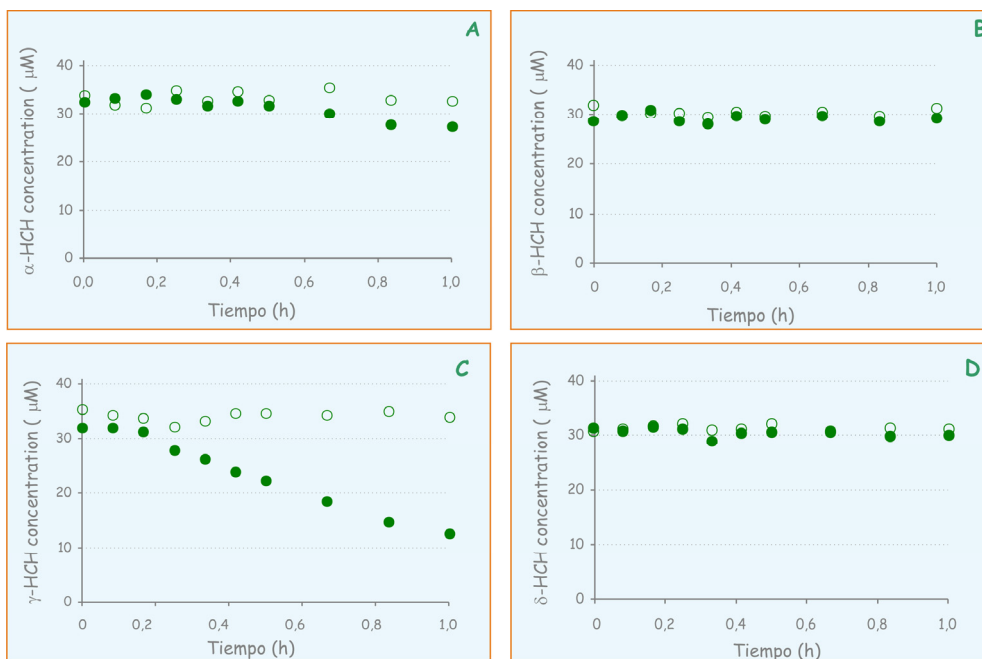
### **Degradación de HCH en ausencia de hidroxocobalamina**

Tras una hora de incubación sólo en presencia de tampón tris-HCl no se observa degradación de HCH (Figuras. 4.3 y 4.4).

Cuando se añadió DTT al sistema y después de una hora de incubación no se observó degradación de HCH (Figura 4.3). Sin embargo, al usar citrato de Ti (III) (agente con mayor capacidad reductora), se observó desaparición de los isómeros  $\gamma$ - y  $\alpha$ -HCH (Figura 4.4), lo cual nos indica la influencia del poder reductor sobre la degradación de estos isómeros de HCH en este último caso. Después de una hora los porcentajes de desaparición fueron de 62,9% y 16,6% para los isómeros  $\gamma$ - y  $\alpha$ -HCH, respectivamente.

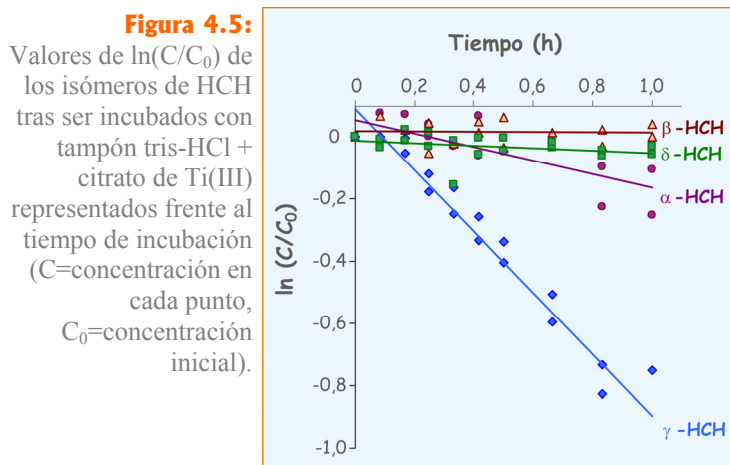


**Figura 4.3:** Concentración de los isómeros (A) α-HCH, (B) β-HCH, (C) γ-HCH, y (D) δ-HCH tras ser incubados con tampón tris-HCl (○) y con tampón tris-HCl + DTT (●).



**Figura 4.4:** Concentración de los isómeros (A) α-HCH, (B) β-HCH, (C) γ-HCH y (D) δ-HCH, tras ser incubados con tampón tris-HCl (○) y con tampón tris-HCl + citrato de Ti (III) (●).

En los isómeros  $\gamma$ - y  $\alpha$ -HCH es evidente una cinética degradación de pseudo-primer orden a orden cero, tal como se muestra en la Figura 4.5, en la que se representa el  $\ln(C/C_0)$  frente al tiempo de incubación, donde C es la concentración de HCH en el sistema con citrato de Ti(III) a tiempo t y  $C_0$  es la concentración inicial de isómero a tiempo  $t=0$ , esto sugiere que podría haber un paso limitante en la degradación independiente de la concentración de HCH.

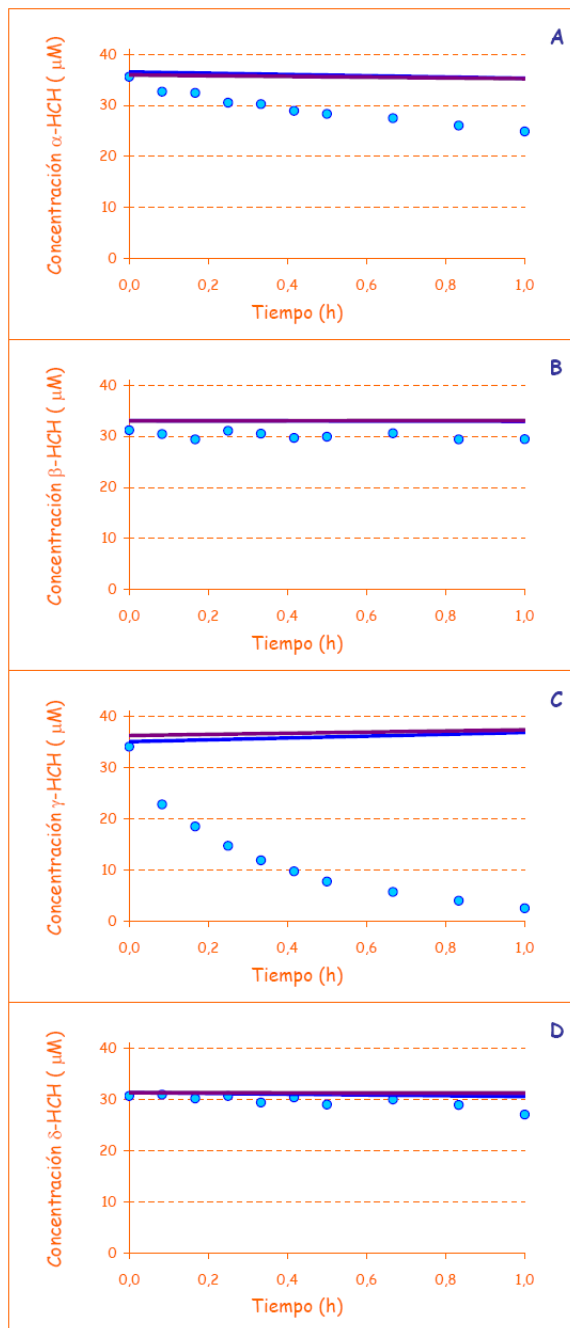


## Degradación de HCH en presencia de hidroxocobalamina

La adición de hidroxocobalamina al sistema en el que se usa como agente reductor DTT favoreció principalmente la degradación de los isómeros  $\gamma$ - y  $\alpha$ -HCH (desaparición del 92,9 y 30,8% al cabo de una hora, respectivamente); la degradación de los isómeros  $\delta$ -HCH y  $\beta$ -HCH fue mucho menor (del 11,9% o imperceptible, respectivamente) (Figura 4.6). Estos resultados reflejan el importante papel del catalizador ya que su adición conduce a una mayor deshalogenación de los isómeros de HCH, compensando de este modo el potencial reductor más débil del DTT comparado con el citrato de Ti(III).

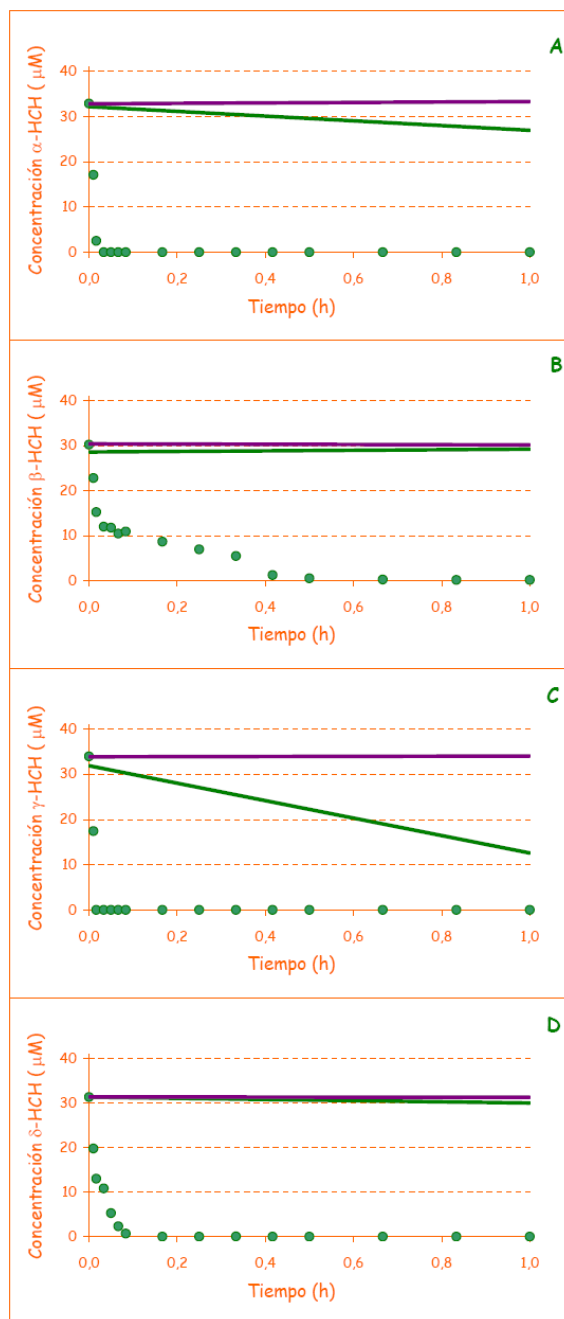
La adición de hidroxocobalamina al sistema con citrato de Ti(III) favoreció la degradación de todos los isómeros de HCH estudiados (Figura 4.7). Así, los isómeros  $\gamma$ - y  $\alpha$ -HCH desaparecieron hasta niveles indetectables ( $<0,1\%$ ) después de 1 y 2 minutos, respectivamente y, aunque la degradación de los isómeros  $\delta$ -HCH y  $\beta$ -HCH fue más lenta, desaparecieron casi totalmente (en un 99,9 y 99,6%, respectivamente) después de 10 y 60 minutos, respectivamente.

La velocidad de degradación siguió el orden  $\gamma$ -HCH  $>$   $\alpha$ -HCH  $>$   $\delta$ -HCH  $>$   $\beta$ -HCH, que fue independiente del reductor usado. Este orden coincide con la disminución del número de átomos de Cl en posición axial de estos isómeros (considerando su configuración más estable termodinámicamente):  $\gamma$ -HCH con 3 Cls axiales,  $\alpha$ -HCH con 2 Cls axiales,  $\delta$ -HCH con 1 Cl axial y  $\beta$ -HCH con todos los átomos de Cl en posición ecuatorial. Este orden de la velocidad de degradación también estuvo de acuerdo con estudios previos de degradación reductiva de los isómeros de HCH, en los que se usaban lodos anóxicos esterilizados (Buser and Müller, 1995).



**Figura 4.6:**

Concentración de los isómeros (A) α-HCH, (B) β-HCH, (C) γ-HCH y (D) δ-HCH tras ser incubados con tampón tris-HCl + DTT + vitamina B<sub>12a</sub> (●), y en los controles sin (—) y con (—) DTT.



**Figura 4.7:**

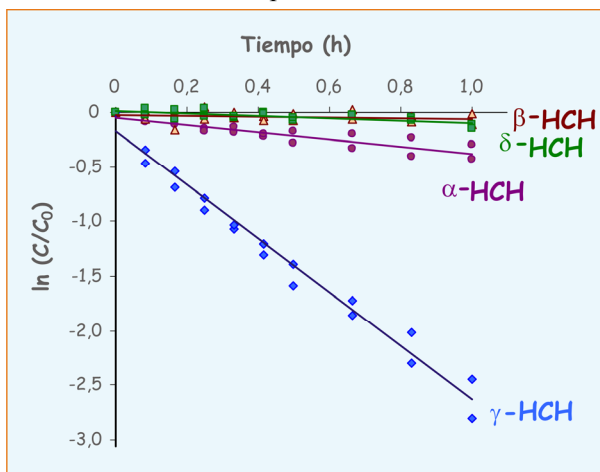
Concentración de los isómeros (A) α-HCH, (B) β-HCH, (C) γ-HCH y (D) δ-HCH tras ser incubados con tampón tris-HCl + citrato de Ti(III) + vitamina B<sub>12a</sub> (●), y en los controles sin (—) y con (—) citrato de Ti(III).

*Cinética de degradación de HCH en el sistema DTT + hidroxocobalamina.*

Las curvas de desaparición de  $\gamma$ - y  $\alpha$ -HCH en el sistema DTT + hidroxocobalamina (Figura 4.6) mostraron un proceso inicial rápido, pero corto (en los primeros 5 minutos de incubación), seguido de un proceso más lento. Este tipo de mecanismo puede equipararse al de las reacciones enzimáticas, con cinética de tipo Michaelis-Menten, en las que generalmente se observa una cinética de aparente orden cero resultante de la saturación de los enzimas con el sustrato (Beurskens et al., 1991). Se sabe que la reacción de especies en un sistema tiol +  $B_{12r}$  es un complejo  $B_{12r}$ -tiolato, que se forma en una reacción rápida y es mucho más reactivo que la  $B_{12r}$  por sí sola (Chiu and Reinhard, 1996). La reacción de deshalogenación sugerida por estos autores ocurre a través de la transferencia de un electrón del complejo Co(II)-tiolato al cloruro orgánico. Por tanto, de la saturación del complejo  $B_{12r}$ -tiolato reaccionando con el HCH pueden esperarse cinéticas de orden cero aparente. Sin embargo, las principales formas de las curvas de degradación de  $\gamma$ - y  $\alpha$ -HCH no reflejan cinética de orden cero (Figuras 4.6 y 4.8), sino solamente cinéticas de pseudo-

primer orden. De todos modos no se puede descartar que el proceso que se observa, inicialmente rápido pero seguido de uno lento, siga cinética de orden cero, pero no podemos confirmarlo debido a la carencia de datos sobre la fase inicial de la incubación.

Como se observa en la Figura 4.8 (en la que se representa  $\ln(C/C_0)$  frente al tiempo de incubación) los datos del proceso lento de la degradación de  $\gamma$ - y  $\alpha$ -HCH en el sistema DTT + hidroxocobalamina muestran una buena linealidad, con coeficientes de correlación ( $r$ ) > 0,97. Los valores de la constante de velocidad  $k_l'$  obtenidos usando un modelo de no-intercepción fueron de 0,30 y 2,34  $h^{-1}$ , para  $\alpha$ - y  $\gamma$ -HCH, respectivamente. Los valores de la



**Figura 4.8:**

Valores de  $\ln(C/C_0)$  de los isómeros de HCH tras incubación en disolución con tampón tris-HCl + DTT + vitamina  $B_{12a}$  representados frente al tiempo de incubación ( $C$ =concentración en cada punto,  $C_0$ =concentración inicial).

constante de velocidad  $k_I'$  calculados a partir de los datos obtenidos por Marks et al. (1989), quienes estudiaron la degradación de  $\gamma$ -HCH usando diferentes corrinas y porfinas en presencia de DTT a las mismas concentraciones que en este estudio, fueron de  $k_I' = 19,5 \text{ h}^{-1}$  para la dicianida cobalamida y alrededor de 8 veces menor para la cianocobalamina ( $2.3 \text{ h}^{-1}$ ). El último valor es similar al valor de la constante  $k_I'$  obtenido en este estudio para la deshalogenación de  $\gamma$ -HCH en el sistema DTT + hidroxocobalamina.

A pesar de que los datos del proceso más lento se ajustaron bien a una cinética de pseudo-primer orden, la razón de la continua disminución de la pendiente en las curvas de degradación de  $\alpha$ - y  $\gamma$ -HCH en el sistema DTT + hidroxocobalamina con el tiempo (Figura 4.6) podría, sin embargo, no estar causada por una dependencia de la velocidad de degradación de la concentración de HCH, sino por la inactivación progresiva de la coenzima. En un estudio de degradación de  $\text{CCl}_4$  en un sistema con tiol, Chiu y Reinhard (1996) observaron la formación de alquil-cobalamina, que es químicamente inerte. La ruptura reductiva del enlace Co-C por el agente reductor, que ocurre en el sistema con citrato de Ti(III) a pH alcalino (Chiu and Reinhard, 1995) es improbable en presencia de DTT porque el potencial redox del DTT es demasiado elevado. Por lo tanto, la reacción observada en la fase lenta del sistema DTT + hidroxocobalamina puede estar limitada por una progresiva inactivación de la hidroxocobalamina, causada por la formación de un enlace estable Co-C. Otra posible causa de la inactivación de la hidroxocobalamina puede ser una modificación covalente del macrociclo por intermedios reactivos. Es improbable que las sucesivas reducciones de  $\text{B}_{12a}$  a  $\text{B}_{12r}$  por el DTT durante el transcurso de la reacción sean el paso limitante de la velocidad de la reacción al pH y relación molar DTT:hidroxocobalamina usados en esta estudio (ver el apartado anterior). Serían necesarias más investigaciones para evaluar el papel exacto de la vitamina  $\text{B}_{12a}$  en la deshalogenación de los isómeros de HCH.



### *Cinética de degradación de HCH en el sistema citrato de Ti(III) + hidroxocobalamina.*

La degradación de  $\gamma$ - y  $\alpha$ -HCH en el sistema citrato de Ti(III) + hidroxocobalamina (Figura 4.7), fue prácticamente instantánea, especialmente la del  $\gamma$ -HCH, por lo que fue imposible realizar un estudio de la cinética de degradación.

Los datos correspondientes a la degradación de  $\delta$ -HCH durante los primeros cinco minutos del experimento nos llevan a un modelo cinético de orden cero (no mostrado); los procesos siguientes, hasta el minuto 10, indicaron un modelo de pseudo-primer orden; después de eso, la concentración de  $\delta$ -HCH disminuyó lentamente. Chiu y Reinhard (1995) describieron cinéticas parecidas en reacciones con  $\text{CCl}_4$  catalizadas por cianocobalamina en disolución acuosa de citrato de Ti(III).

La degradación de  $\beta$ -HCH fue menor que la de los otros isómeros (Figura 4.7), y mostró una fase inicial rápida, de un minuto de duración, seguida por una fase más lenta; no se obtuvieron buenos ajustes para las cinéticas de orden cero o de pseudo primer orden (no mostrado).

La elevada velocidad de reacción observada en presencia de  $\text{B}_{12\text{s}}$  se debe probablemente, al fuerte carácter nucleófilo de esta molécula en la dirección axial, que se relaciona con las características direccionales y la alta densidad de carga del par electrónico libre del orbital  $d_{z^2}$  del Co(I) (Lexa and Saveant, 1983; Schrauzer and Deutsch, 1969; Schrauzer et al., 1968). Varios investigadores han estudiado la reacción de  $\text{B}_{12\text{s}}$  con alcanos halogenados siguiendo un mecanismo  $\text{S}_{\text{N}}2$  (Schrauzer and Deutsch, 1969; Datta and Sharma, 1987; Stadlbauer et al., 1974), pero, en las búsquedas bibliográficas realizadas no se encontraron datos acerca del ataque del par electrónico libre de  $\text{B}_{12\text{s}}$  a alcanos cíclicos.

### **Productos formados en la degradación de HCH**

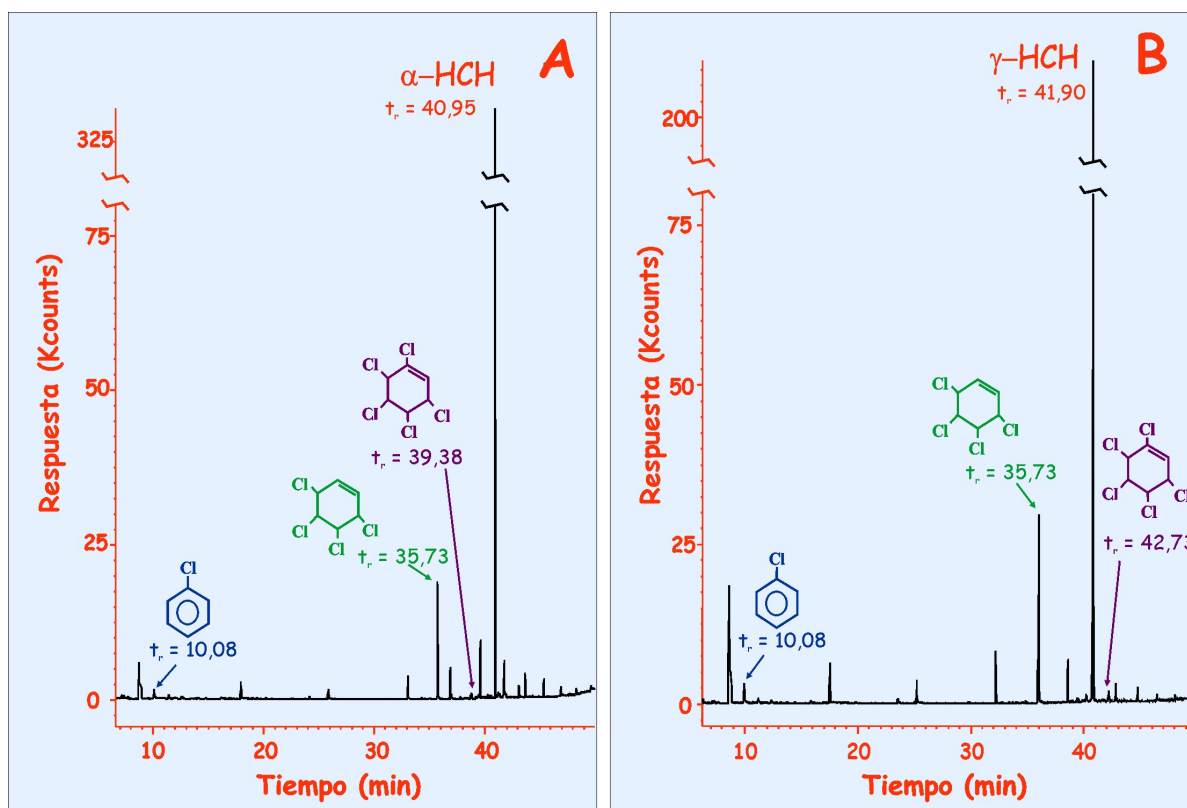
#### *Productos formados en el sistema tris-HCl + DTT + hidroxocobalamina*

En los cromatogramas correspondientes a muestras de los isómeros  $\alpha$ - y  $\gamma$ -HCH en el sistema DTT + hidroxocobalamina se detectaron 3 picos correspondientes a productos de degradación (Figura 4.9), los compuestos que

dieron lugar a estos picos fueron identificados a través de sus espectros de masas como pentaclorociclohexeno (PCCH), tetraclorociclohexeno (TeCCH) y clorobenceno (CB) (Figura 4.10). El espectro de masas de PCCH mostró picos correspondientes a los fragmentos con relación  $m/z$  de 217 y 181 (Figura 4.10A). El espectro de masas de TeCCH muestra picos correspondientes a los fragmentos con relación  $m/z$  de 181 y 147 (Figura 4.10B). El espectro de masas de CB muestra un pico correspondiente al fragmento con relación  $m/z$  de 112 (Figura 4.10C).

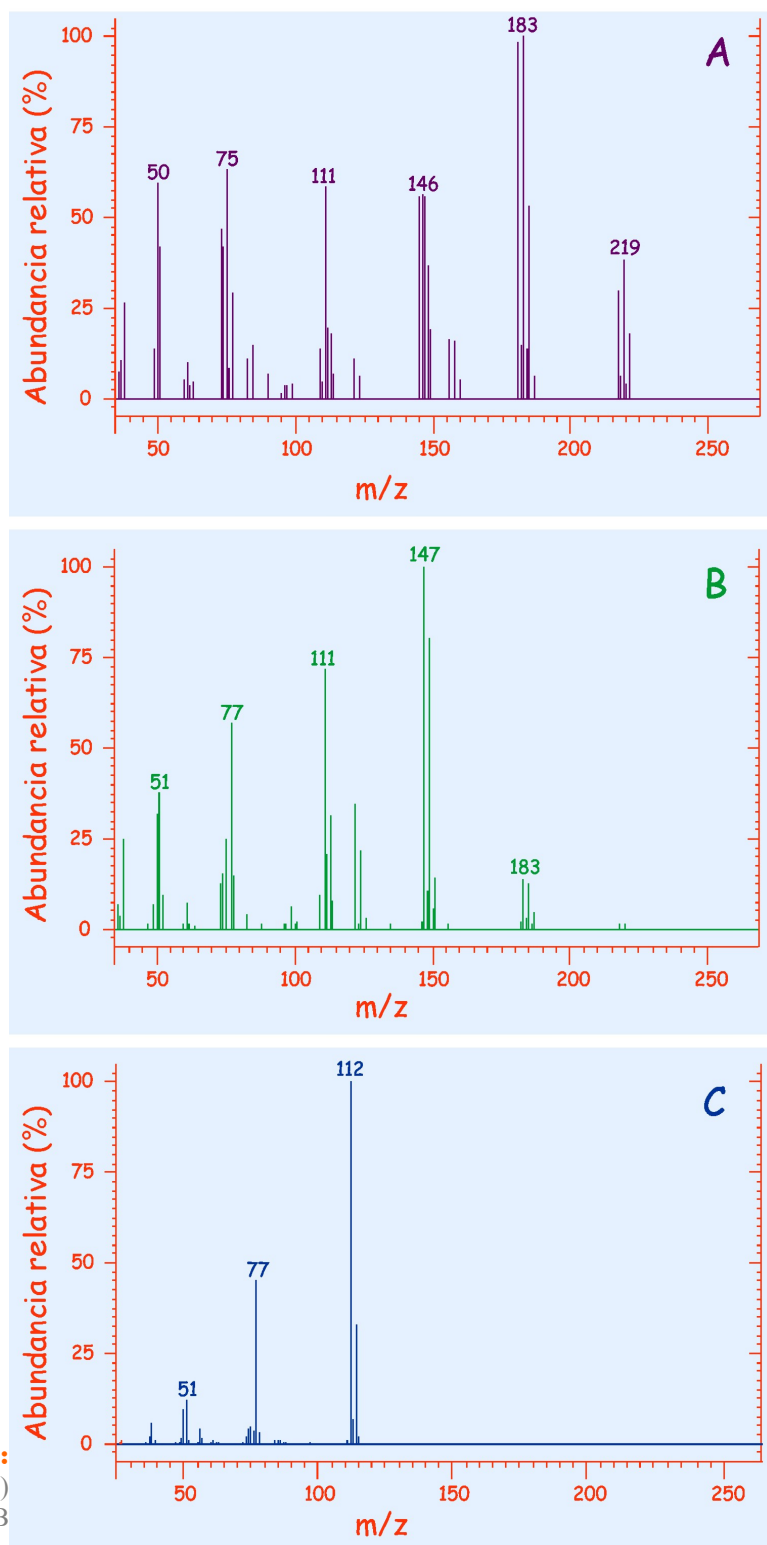
Los picos correspondientes a PCCH en ambos cromatogramas (muestras  $\alpha$ - y  $\gamma$ -HCH) son pequeños, mientras que se observaron grandes picos de TeCCH, especialmente en la muestra de  $\gamma$ -HCH (Figura 4.9). Esto coincide con la hipótesis de que  $\alpha$ - y  $\gamma$ -HCH experimentaron dihaloeliminación, tal como sugieren varios autores (Middeldorp et al., 1996; Ohisa et al., 1980). De hecho, el TeCCH se ha detectado como metabolito intermedio cuando la degradación de HCH comienza por un paso reductivo (tanto en condiciones bióticas como abióticas) (Jagnow et al., 1977; Middeldorp et al., 1996; Marks et al., 1989; Ohisa et al., 1980). En cambio, el PCCH generalmente se detectaba como el primer metabolito intermedio cuando la degradación de HCH comenzaba por un paso oxidativo (Johri et al., 1998; Nagata et al., 1999; Sahu et al., 1990) y también en reacciones de hidrólisis (Liu et al., 2003). Así, la detección de PCCH en sistemas de  $\alpha$ - y  $\gamma$ -HCH puede ser atribuible a reacciones de hidrólisis, cuya velocidad aumenta en condiciones alcalinas (Liu et al., 2003). La presencia de CB en la mezcla reactiva puede explicarse por una dihalo-eliminación del TeCCH para formar diclorociclohexadieno seguida de una deshidrohalogenación para formar el CB, tal y como sugieren Ohisa et al. (1980), que trabajaron en sistemas bióticos. Marks et al. (1989) también observaron la formación de CB como producto final en sistemas abióticos, igual que en este trabajo (Figura 4.9). La mayor velocidad de degradación de  $\gamma$ -HCH (con 3 átomos de Cl en posición axial), comparada con la de  $\alpha$ -HCH (con 2 átomos de Cl en posición axial) encaja con la dihalo-eliminación anti-periplanar, en la que los dos átomos de Cl eliminados están en posición axial y antiparalela, tal como sugerían Buser y Müller (1995). Aunque esta hipótesis no pudo confirmarse porque no se disponía de isómeros de TeCCH de referencia, sin

embargo, se pudo confirmar que los isómeros de TeCCH formados durante la degradación de  $\alpha$ - y  $\gamma$ -HCH en el sistema DTT+hidroxocobalamina son diferentes puesto que el pico de TeCCH en el cromatograma correspondiente a la degradación de  $\alpha$ -HCH aparece más pronto ( $t = 35,73$  min) Figura 4.9A) que el correspondiente a la degradación de  $\gamma$ -HCH ( $t = 36,96$  min) (Figura 4.9B)).



**Figura 4.9:**

Cromatogramas de las muestras de degradación de (A)  $\alpha$ -HCH y (B)  $\gamma$ -HCH obtenidas después de incubar durante 20 minutos en una disolución con tampón tris-HCl + DTT + vitamina B<sub>12a</sub>.



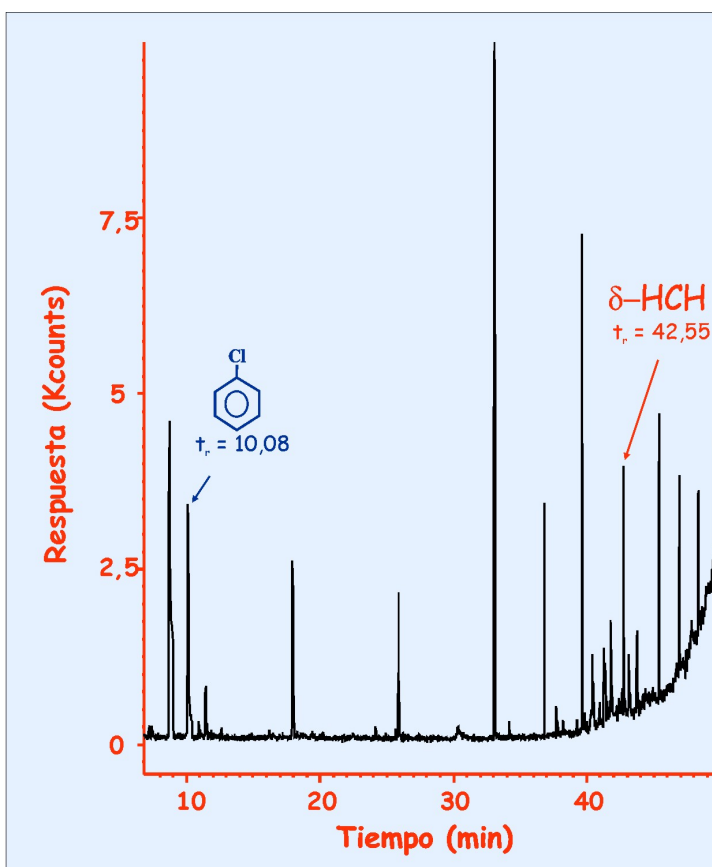
**Figura 4.10:**  
Espectros de masas de: (A)  
PCCH, (B) TeCCH y (C) CB

### *Productos formados en el sistema tris-HCl + citrato de Ti(III)*

En los cromatogramas correspondientes a los sistemas en los que estaban presentes los isómeros  $\alpha$ - o  $\gamma$ -HCH (no mostrado) se detectaron cantidades traza de PCCH, TeCCH y CB. Al contrario de lo que se observó en los sistemas en los que estaba presente DTT + hidroxocobalamina, se identificaron varios isómeros de PCCH y TeCCH en cada uno de los sistemas de reacción: (i) cuatro isómeros de PCCH y tres de TeCCH en el sistema  $\alpha$ -HCH y (ii) dos isómeros de PCCH y dos de TeCCH en el sistema  $\gamma$ -HCH, lo que indica la influencia del poder reductor sobre la de reacción que tiene lugar. Estos resultados sugieren que hay: (i) otros mecanismos, además de la eliminación antiperiplanar (en el caso de  $\alpha$ -HCH y  $\gamma$ -HCH), como la dihaloeliminación, no necesariamente antiperiplanar, (ii) reacciones de isomerización y/o (iii) la posibilidad de contaminación con alguno de los reactivos usados en el trabajo experimental (las purezas de los isómeros de HCH usados en este estudio están en el rango 98-99%). Después de la deshalogenación inicial, la reacción podría continuar a través de una deshalogenación de TeCCH y luego una conversión por deshidrohalogenación en CB.

### *Productos formados en el sistema tris-HCl + citrato de Ti(III) + hidroxocobalamina*

El clorobenceno se detectó en todos los cromatogramas, junto a pequeñas cantidades de PCCH y TeCCH (Figura 4.11), esto apunta al CB como el producto final más probable, lo que está de acuerdo con otras investigaciones que estudiaron la degradación de HCH en condiciones abióticas (Marks et al., 1989; Beurskens et al., 1991). En otros estudios, trabajando bajo condiciones metanogénicas, también se sugería la deshidrohalogenación seguida de dihaloeliminación a benceno (Middeldorp et al., 1996; van Eekert et al., 1998). Estos últimos investigadores sugirieron que el CB es el producto formado espontáneamente en una reacción abiótica no redox, mientras que la formación de benceno está microbiológicamente mediada.



**Figura 4.11:**

Cromatograma de la muestra de degradación de  $\delta$ -HCH obtenida después de incubar durante 5 minutos en una disolución con tampón tris-HCl + citrato de Ti(III) + vitamina B<sub>12a</sub>.

### Conclusiones

1. En condiciones reductoras y a pH 8,9, el cobalto de la hidroxocobalamina se reduce en menos de 2 minutos de Co(III) a Co(II) en presencia de DTT, mientras que se reduce de Co(III) a Co(I) en presencia de citrato de Ti(III).
2. En las condiciones reductoras generadas por DTT no se produce degradación; sin embargo, existe degradación parcial de  $\gamma$ - y  $\alpha$ -HCH cuando se usa citrato de Ti(III) como reductor.
3. La adición de hidroxocobalamina al sistema con DTT favorece la desaparición de  $\gamma$ - y  $\alpha$ -HCH, pero no la de  $\beta$ - y  $\delta$ -HCH. La adición de hidroxocobalamina al sistema con citrato de Ti(III) acelera la degradación de  $\gamma$ - y  $\alpha$ -HCH (niveles indetectables en 1 y 2 minutos, respectivamente) y produce la degradación de  $\beta$ - y  $\delta$ -HCH (99,6% en 60 minutos y 99,9% en 10 minutos, respectivamente).
4. Este ensayo es el primero en describir una degradación rápida de los isómeros  $\beta$ - y  $\delta$ -HCH bajo condiciones abióticas.

## Referencias

- Assaf-Anid, N., K.F. Hayes and T.M. Vogel. 1994. Reductive dechlorination of carbon tetrachloride by cobalamin (II) in the presence of dithiothreitol: Mechanistic study, effect of redox potential and pH. *Environ. Sci. Technol.* 28:246-252.
- Bachmann, A., P. Walet, P. Wijnen, W. de Bruin, J.L.M. Huntjens, W. Roelofsen and A.J.B. Zehnder. 1988. Biodegradation of alpha-, and beta-hexachlorocyclohexane in a soil slurry under different redox conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:143-149.
- Beurskens, J.E.M., A.J.M. Stams, A.J.B. Zehnder and A. Bachmann. 1991. Relative Biochemical Reactivity of three hexachlorocyclohexane isomers. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 21:128-136.
- Breivik, K., J.M. Pacyna and J. Münch. 1999. Use of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane in Europe, 1970-1996. *Sci. Total Environ.* 239:151-163.
- Buser, H.R. and M.D. Müller. 1995. Isomer and enantioselective degradation of hexachlorocyclohexane isomers in sewage sludge under anaerobic conditions. *Environ. Sci. Technol.* 29:664-672.
- Chiu, P-C. and M. Reinhard. 1995. Metallocoenzyme-mediated reductive transformation of carbon tetrachloride in titanium(III) citrate aqueous solution. *Environ. Sci. Technol.* 29:595-603.
- Chiu, P-C. and M. Reinhard. 1996. Transformation of carbon tetrachloride by reduced vitamin B12 in aqueous cysteine solution. *Environ. Sci. Technol.* 30:1882-1889.
- Datta, D. and G.T. Sharma. 1987. Studies on the alkylation of vitamin B12s and related systems revisited: novel features of oxidative-addition reactions. *Inorg. Chem.* 26:329-332.



- Doelman, P., L. Haanstra, E. de Ruiter and J. Slange. 1985. Rate of microbial degradation of high concentrations of alfa-hexachlorocyclohexane in soil under aerobic and anaerobic conditions. *Chemosphere*. 14:565-570.
- Giorgetti, M., I. Ascone, M. Berrettoni, P. Conti, S. Zamponi and R. Marassi. 2000. In situ X-ray absorption spectroelectrochemical study of hydroxocobalamin. *JBIC*. 5:156-166.
- Glod, G., W. Angst, C. Holliger and R.P. Schwarzenbach. 1997. Corrinoid-mediated reduction of tetrachloroethene, trichloroethene, and trichlorofluoroethene in homogeneous aqueous solution: reaction kinetics and reaction mechanisms. *Environ. Sci. Technol.* 31:253-260.
- Jagnow, G., K. Haider and P.Chr. Ellwardt. 1977. Anaerobic dechlorination and degradation of hexachlorocyclohexane isomers by anaerobic and facultative anaerobic bacteria. *Arch. Microbiol.* 115:285-292.
- Johri, A.K., M. Dua, D. Tuteja, R. Saxena, D.M. Saxena and R. Lal. 1998. Degradation of alpha, beta, gamma and delta-hexachlorocyclohexanes by *Sphingomonas paucimobilis*. *Bitechnology Letters*. 9:885-887.
- Kliewer, K.E. and M.J. Morra. 1998. Sorption and redox activity of cobalt corrinoids on hectorite. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 62:916-922.
- Kuhn, E.P. and J.M. Suflita. 1989. Dehalogenation of pesticides by anaerobic microorganisms in soils and groundwater – A review. p. 111-180. In B.L. Sawhney and K. Brown (eds.) *Reactions and Movements of Organic Chemicals in Soils*. SSSA and ASA, Madison, Wisconsin.
- Lewis, T.A., M.J. Morra and P.D. Brown. 1996. Comparative product analysis of carbon tetrachloride dehalogenation catalyzed by cobalt corrins in the presence of thiol or titanium (III) reducing agents. *Environ. Sci. Technol.* 30:292-300.
- Lexa, D. and J.M. Saveant. 1983. The electrochemistry of vitamin B12. *Acc. Chem. Res.* 16:235-243.

- Li, Y.F., T.F. Bidleman, L.A. Barrie and L.L. McConnell. 1998. Global hexachlorocyclohexane use trends and their impact on the artic atmospheric environment. *Geophys. Res. Lett.* 25:39-41.
- Liu, X., P. Peng, J. Fu and W. Huang. 2003. Effects of FeS on the Transformation Kinetics of  $\gamma$ -Hexachlorocyclohexane *Environ. Sci. Technol.* 37:1822-1828.
- Marks, T.S., J.D. Allpress and A. Maule. 1989. Dehalogenation of lindane by a variety of porphyrins and corrins. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1258-1261.
- Matsumura, F., H.J. Benezet and K.C. Patil. 1976. Factors affecting microbial metabolism of  $\gamma$ -BHC. *J. Pestic. Sci.* 1:3-8.
- Middeldorp, P.J., M. Jaspers, A.J.B. Zehnder and G. Schraa. 1996. Biotransformation of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, and  $\delta$ -hexachlorocyclohexane under methanogenic conditions. *Environ. Sci. Technol.* 30:2345-2349.
- Monterroso, M. C., M. Camps Arbestain, R. Calvelo, B. Rodríguez Garrido, S. Muniategui, P. López Mahía, D. Prada and F. Macías. 2002. Environmental fate and behavior of HCH isomers in a soil-plant system in a contaminated site. *Dioxin 2002, 22nd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, Barcelona.* 59:307-310.
- Morra, M.J., V. Borek and J. Koolpe. 2000. Transformation of chlorinated hydrocarbons using aquocobalamin or coenzyme F430 in combination with zero-valent iron. *J. Environ. Qual.* 29:706-715.
- Mougin, C., C. Pericaud, C. Malosse, C. Laugero and M. Asther. 1996. Biotransformation of the insecticide lindane by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Pestic. Sci.* 47:51-59.

- Nagata, Y., K. Miyauchi and M. Takagi. 1999. Complete analysis and enzymes for  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane degradation in *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *J. Indust. Microbiol. Biotech.* 23:380-390.
- Ohisa, N., M. Yamaguchi and N. Kurihara. 1980. Lindane degradation by cell-free extracts of *Clostridium rectum*. *Arch. Microbiol.* 125:221-225.
- Reinhard, M., M. Semadeni, P.K. Sharma and W.R. Haag. 1999. Dehalogenation of haloaliphatic hydrocarbon compounds in the aquatic and terrestrial environment. p. 133-174. In D.C. Adriano, J-M. Bollag, W.T. Frankenberger, Jr., and R.C. Sims (eds.) *Bioremediation of Contaminated Soils*. Agronomy Monograph no. 37, Madison, Wisconsin.
- Sahu, S.K., K.K. Patnaik, M. Sharmila and N. Sethunathan. 1990. Degradation of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane by a soil bacterium under aerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3620-3622.
- Sahu, S.K., K.K. Patnaik, S. Bhuyan, B. Sreedharan, N. Kurihara, T.K. Adhya and N. Sethunathan. 1995. Mineralization of  $\alpha$ -,  $\gamma$ -, and  $\beta$ -isomers of hexachlorocyclohexane by a soil bacterium under aerobic conditions. *J. Agric. Food Chem.* 43:833-837.
- Schrauzer, G.N. and E. Deutsch. 1969. Reactions of cobalt(I) supernucleophiles. The alkylation of vitamin B<sub>12</sub>s, cobaloximes(I), and related compounds. *J. Am. Chem. Soc.* 91:3341-3350.
- Schrauzer, G.N., E. Deutsch and R.J. Windgassen. 1968. The nucleophilicity of vitamin B<sub>12</sub>s. *J. Am. Chem. Soc.* 90:2441-2442.
- Stadlbauer, E.A., R.J. Holland, F.P. Lamm and G.N. Schrauzer. 1974. Methylcobalamin and methylcobalt complexes of vitamin B<sub>12</sub> model compounds as substrates in nucleophilic displacement reactions. *Bioinorg. Chem.* 4:67-77.
- van Eekert, M.H.A., N.J.P. Van Ras, G.H. Mentink, H.H.M. Rijnaarts, A.J.M. Stams, J.A. Field and G. Schraa. 1998. Anaerobic transformation of  $\beta$ -

hexachlorocyclohexane by methanogenic granular sludge and soil microflora. Environ. Sci. Technol. 32:3299-3304.

Walker, K., D.A. Vallero and R.G. Lewis. 1999. Factors influencing the distribution of lindane and other hexachlorocyclohexanes in the environment. Env. Sci. Technol. 33:4373-4378.



## Capítulo 5

*Deshalogenación reductiva  
de  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH en  
suelos en suspensión*



## Resumen

La elevada presencia de contaminantes orgánicos en el medio ambiente y su alta persistencia y toxicidad hacen necesario el estudio de su eliminación. Una de las alternativas consiste en la degradación de estos contaminantes, para ello se han llevado a cabo estudios en laboratorio en diferentes condiciones y, en menor medida, estudios piloto y estudios *in situ*.

Un factor a tener en cuenta es que estos compuestos tienden a acumularse en la materia orgánica del suelo, lo cual limita su desorción y posterior degradación.

En este trabajo se evaluó la viabilidad de un método de degradación de  $\alpha$ ,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH en suelos en suspensión bajo condiciones anaerobias, usando citrato de titanio (III) como agente reductor y vitamina B<sub>12a</sub> como catalizador. Para ello se realizaron ensayos con dos muestras de suelo con características marcadamente diferentes y a dos escalas de trabajo: a pequeña escala, en sistema “batch”, y posteriormente, a escala de reactor, utilizando un tanque de 2 litros con agitación vigorosa. Los resultados obtenidos mostraron una rápida degradación reductiva de todos los isómeros de HCH cuando el contenido de materia orgánica del suelo era muy bajo, mientras que en el suelo con elevado contenido de materia orgánica no se llega a la completa degradación de los isómeros de HCH, encontrando en este caso importantes diferencias entre el ensayo en batch y en reactor. Mientras que en el ensayo en batch el HCH no degradado se quedó retenido en el suelo, en el ensayo en reactor se observó una detención de la reacción y se detectaron los isómeros de HCH en disolución.



### Introducción.

Los contaminantes orgánicos persistentes (COPs), conocidos por las siglas en inglés POPs, son compuestos químicos que poseen elevados tiempos de vida media en suelos, sedimentos, aire o biota. Generalmente son compuestos hidrofóbicos y lipofílicos. En sistemas acuáticos y suelos se distribuyen mayoritariamente hacia la fase sólida, principalmente hacia la materia orgánica, evitando la fase acuosa (Jones and de Voogt, 1999). Entre los COPs más importantes están muchas familias de compuestos aromáticos halogenados, incluidos los bifenilos policlorados (PCBs), dibenzo-p-dioxinas y furanos (PCDD/F), difeniléteres polibromados (PBDEs) y diferentes pesticidas organoclorados (como el dicloro-difenil-tricloroetano (DDT)) y sus metabolitos, toxafeno, **hexaclorociclohexano** (HCH), etc.

Hay ocho isómeros geométricos del HCH, que se diferencian en las posiciones axiales o ecuatoriales de los átomos de cloro. Uno de los isómeros, el  $\alpha$ -HCH existe en dos formas enantioméricas. El HCH se produce comercialmente mediante cloración fotoquímica de benceno y el producto es una mezcla de diferentes isómeros conocida como HCH técnico (55-80%  $\alpha$ -HCH, 5-14%  $\beta$ -HCH, 8-15%  $\gamma$ -HCH y 2-16%  $\delta$ -HCH (Breivik et al., 1999)). Esta mezcla se usó durante años como insecticida, pero después de descubrir que sólo el isómero  $\gamma$ -HCH presentaba propiedades insecticidas, se comenzó a refinar la forma técnica y comercializarla con el nombre de lindano, que contiene al menos un 99% del isómero  $\gamma$ -HCH (Walker et al., 1999), desechando el resto de los isómeros de forma incontrolada en zonas cercanas al lugar de fabricación y generando un residuo altamente tóxico y persistente (Phillips et al., 2005).

La degradación de los isómeros de HCH más comunes ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH) ha sido estudiada a escala de laboratorio en distintas condiciones, aerobias o anaerobias y bióticas o abióticas. En menor medida se han hecho ensayos piloto y estudios *in situ* (Phillips et al., 2005).

Los estudios realizados por Bachmann et al. (1988) con suelos en suspensión contaminados con  $\alpha$ - y  $\beta$ -HCH en cuatro medios redox diferentes (aerobio, nitrificante, sulfato-reductor y metanogénico) mostraron que el

isómero alfa se degradaba más rápidamente bajo condiciones aerobias mientras que el beta no se degradaba en ninguna de las condiciones estudiadas. Aun así, se ha encontrado al menos dos cepas de bacterias capaces de degradar este isómero aeróbicamente: *Pseudomonas* sp. (Sahu et al., 1995) y *Spingomonas paucimobilis* (Bhuyan et al., 1992; Adhya et al., 1996). La gran ventaja de la degradación oxidativa es la mineralización de HCH a CO<sub>2</sub> al final de la reacción (Bachmann et al., 1988; Sahu et al., 1995), pero tiene como inconveniente que esta mineralización no es completa, y se forman intermedios persistentes, como compuestos fenólicos (Datta et al., 2000; Mougin et al., 1996).

Desde los primeros trabajos de MacRae et al. (1967) se sugirió que la degradación de HCH bajo condiciones anaerobias era más rápida que en condiciones aerobias y que la degradación microbiana era la principal ruta de desaparición de HCH del suelo. Desde entonces se realizaron muchos estudios en condiciones anaerobias, en los que se logró la degradación con diferentes microorganismos, en lodos anaerobios y en suelos contaminados (Jagnow et al., 1977; Buser and Müller, 1995; Middeldorp et al., 1996; Van Eekert et al., 1998). La mayoría de estos trabajos coinciden en que en condiciones anaerobias  $\gamma$ -HCH es el isómero más fácilmente degradable, seguido por  $\alpha$ -HCH, siendo  $\delta$ -HCH y sobre todo el  $\beta$ -HCH los isómeros más recalcitrantes (Buser and Müller, 1995; Jagnow et al., 1977). Este orden en la velocidad de degradación puede explicarse en función de la orientación de los átomos de Cl en cada isómero de HCH, puesto que los átomos de Cl con orientación axial son más reactivos que los ecuatoriales, y el isómero  $\gamma$ -HCH contiene 3 átomos de Cl en posición axial, el isómero  $\alpha$ -HCH contiene 2, el  $\delta$ -HCH 1 y el isómero  $\beta$ -HCH ninguno (Buser and Müller, 1995; Phillips et al., 2005).

Los productos finales de degradación anaerobia encontrados fueron clorobenceno (CB) y benceno, y su formación ocurría espontáneamente (CB) o era mediada enzimáticamente (benceno) (Middeldorp et al., 1996; Van Eekert et al., 1998). Hay algunos microorganismos que pueden mineralizar CB y benceno aeróbicamente, por tanto, una estrategia que implicase una combinación de condiciones anaerobias para iniciar la degradación de HCH, seguida por condiciones aerobias facilitaría la completa eliminación de los productos de

degradación, logrando así la completa mineralización de los isómeros de HCH (Langenhoff et al., 2002).

Aunque la degradación microbiana ha sido la más estudiada también hay estudios de degradación catalizada con compuestos químicos aislados, como complejos con metales de transición (Sims et al., 1991). Marks et al. (1989) demostraron la descloración reductiva de  $\gamma$ -HCH con tetrapirroles usando ditiotreitól (DTT) como agente reductor. Estos tetrapirroles actúan como catalizadores y son los transportadores de electrones en el proceso de descloración reductiva en presencia de una fuente de electrones externa (Assaf-Anid et al., 1994; Chiu and Reinhard, 1995; Lewis et al., 1996; Marks et al., 1989). Assaf-Anid et al. (1992) demostraron la descloración reductiva de 2,3,4,5,6-pentaclorobifenil y hexaclorobenceno con vitamina B<sub>12</sub>, usando DTT o citrato de titanio (III) como reductores.

En un estudio previo realizado en este laboratorio (Rodríguez-Garrido et al., 2004) se demostró la deshalogenación de todos los isómeros de HCH en agua, usando la vitamina B<sub>12a</sub> como catalizador y DTT y citrato de Ti (III) como reductores, aunque la degradación era mucho más rápida utilizando este segundo reductor. Esto era debido a que el cobalto (Co (III)) de la vitamina B<sub>12</sub> se reducía a Co(II) con el DTT, mientras que cuando se usaba el citrato de Ti (III), con mayor capacidad reductora, se lograba su reducción Co(I).

En condiciones naturales los compuestos hidrofóbicos se acumulan en la fase sólida del suelo, con un paso muy limitado a la disolución, por lo que los tratamientos de descontaminación *in situ* (químicos o biológicos) están limitados por la baja velocidad de transferencia de materia que se alcanza en estos sistemas (Harms and Bosma, 1997; Simoni et al., 2001). Para disminuir los tiempos de tratamiento de los suelos contaminados se pueden utilizar biorreactores *ex situ*, en los que el suelo se mantiene en suspensión en medio acuoso, mediante agitación vigorosa también. Bajo estas condiciones, la desorción y disolución de los contaminantes orgánicos se maximiza debido al incremento de la transferencia de materia, producido por la ruptura de los agregados del suelo (Ogwada and Sparks, 1986; Rijnaarts et al., 1990).

La capacidad del suelo para retener a los contaminantes orgánicos depende en gran medida de su cantidad de materia orgánica y la hidrofobicidad

del compuesto. Además, el tamaño de partícula y de agregados y la estructura del suelo contribuyen a que la velocidad de desorción (velocidad de transferencia de materia) sea la etapa limitante en la degradación de los contaminantes orgánicos (Pignatello and Xing, 1996).

El principal objetivo de este trabajo es estudiar la degradación de los isómeros  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH en suelos en suspensión en medio anaerobio, usando como catalizador de la reacción la vitamina B<sub>12a</sub> reducida con citrato de Ti (III). El estudio se realizó a pequeña escala en sistema “batch” y en un reactor, utilizando dos muestras de suelo artificialmente contaminadas que presentaban contenidos en materia orgánica marcadamente diferentes.

## Material y métodos

### Reactivos utilizados

Los isómeros  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\delta$ - HCH (pureza 98,7, 98,1 y 98,6%, respectivamente), el cloruro de titanio (III) (pureza 15%, en disolución de ácido clorhídrico) y el clorobenceno (99,9% de pureza) proceden de Riedel-de-Haën AG (Seelze, Alemania); el isómero  $\gamma$ -HCH (99% de pureza), ácido cítrico anhidro (99,5% de pureza) y el tampón Tris (2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol) (99% de pureza) proceden de Sigma (St. Louis, MO); la acetona (99,5% de pureza), el hexano (99,0% de pureza) y la vitamina B<sub>12a</sub> (hidroxocobalamina, 96% de pureza) proceden de Fluka Chemical Corp. (Ronkonkoma, NY).

Para los ensayos de degradación se prepararon las siguientes disoluciones:

- Disolución contaminante: contenía 1 g L<sup>-1</sup> de cada uno de los isómeros de HCH ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -).
- Tampón tris 400 mM, que se ajustó a pH 8,9 con HCl (tris-HCl).

- Disolución reductora: El Ti (III) es un fuerte reductor inorgánico pero a pH neutro precipita como hidróxido ( $\text{Ti}(\text{OH})_3$ ), por lo que se añadió citrato como agente complejante. El citrato de titanio (III) ( $E^\circ [\text{Ti}(\text{IV})/\text{Ti}(\text{III})] = -480\text{mV}$ ) es un complejo de color azul violeta, que se decolora al oxidarse, y en este trabajo se usó como agente reductor de la vitamina  $\text{B}_{12\text{a}}$ . Las disoluciones de citrato de Ti (III) se prepararon a partir de ácido cítrico y de cloruro de Ti (III) en una relación molar 2:1 y en tampón tris 200 mM. En este caso el tampón tris no se ajustó con ácido porque la disolución de  $\text{TiCl}_3$  comercial utilizada está en medio HCl. Inmediatamente después de preparar la disolución se tapó y se purgó con  $\text{N}_2$ .
- Disolución de catalizador: contenía  $0,18 \text{ g L}^{-1}$  de vitamina  $\text{B}_{12\text{a}}$  en tampón tris-HCl 200mM.

### La vitamina $\text{B}_{12\text{a}}$

La vitamina  $\text{B}_{12\text{a}}$  es una molécula en la que un átomo de cobalto está coordinado a los 4 átomos de nitrógeno de un anillo de corrina. En condiciones normales el átomo de Co está en estado de oxidación +3, con dos ligandos axiales: en la posición  $\alpha$  el 5,6-dimetilbenzimidazol y en la posición  $\beta$   $\text{H}_2\text{O}$  (a  $\text{pH} < 7,8$ , en este caso se llama a la vitamina  $\text{B}_{12\text{a}}$  aquocobalamina) o OH (a  $\text{pH} > 7,8$ , en este caso se llama a la vitamina  $\text{B}_{12\text{a}}$  hidroxocobalamina) (IUPAC, 1976). Bajo condiciones reductoras el Co (III) de la vitamina  $\text{B}_{12\text{a}}$  puede reducirse a Co (II) ( $\text{B}_{12\text{r}}$ ) o a Co (I) ( $\text{B}_{12\text{s}}$ ). Esta reducción es fácilmente visible por el cambio de color de rojo fresa ( $\text{B}_{12\text{a}}$ ) a ámbar ( $\text{B}_{12\text{r}}$ ) y a azul ( $\text{B}_{12\text{s}}$ ). En un estudio espectrofotométrico previo (Capítulo 4) se demostró la presencia de las diferentes formas de la vitamina en diferentes medios redox, y se observó que  $\text{B}_{12\text{s}}$  era la forma predominante presente en una disolución con exceso de citrato de Ti (III).

### **Muestras de suelo utilizadas**

Para los ensayos de degradación se utilizaron dos muestras de suelo sin contaminar procedentes de los horizontes A y B de un Umbrisol Cámbico desarrollado sobre granito del área de Pontevea (Pontevedra), con vegetación de pinar de repoblación. Es un suelo de textura arenosa franca, ácido, con muy bajo contenido en arcilla, muy baja capacidad de intercambio catiónico efectiva y complejo de cambio dominado por aluminio. La materia orgánica es el componente diferenciador de las dos muestras. El horizonte A presenta un contenido de materia orgánica relativamente elevado (4,26% C), mientras que está prácticamente ausente en el horizonte B. Para este estudio las muestras se denominaron: suelo arenoso (suelo Ar) al horizonte B y suelo con materia orgánica (suelo MO) al horizonte A (Tabla 5.1)

Los suelos fueron secados a temperatura ambiente, tamizados por 2 mm, homogeneizados y molidos. Posteriormente fueron contaminados artificialmente con una disolución de acetona que contenía una concentración individual de 1 g L<sup>-1</sup> de cada uno de los isómeros de HCH y esta mezcla permaneció durante 24 horas en la campana para facilitar la evaporación completa de la acetona. La concentración final de cada uno de los isómeros ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -) de HCH en el suelo fue de 50 mg kg<sup>-1</sup>.

**Tabla 5.1:**

Propiedades de los suelos utilizados en el en el ensayo de degradación.

	Suelo MO	Suelo Ar
pH (H <sub>2</sub> O)	4,86	5,12
pH (KCl)	3,78	3,99
C (g Kg <sup>-1</sup> )	42,6	3,3
N (g Kg <sup>-1</sup> )	2,89	1,1
Relación C:N	14,7	2,9
<sup>1</sup> CIC (cmol(+) Kg <sup>-1</sup> )	4,02	1,68
Ca <sup>2+</sup> (cmol(+) Kg <sup>-1</sup> )	0,13	0,09
Mg <sup>2+</sup> (cmol(+) Kg <sup>-1</sup> )	0,14	0,04
Na <sup>+</sup> (cmol(+) Kg <sup>-1</sup> )	0,42	0,41
K <sup>+</sup> (cmol(+) Kg <sup>-1</sup> )	0,11	0,11
Al <sup>3+</sup> (cmol(+) Kg <sup>-1</sup> )	3,22	1,03
Arena (%)	80,8	84,2
Limo (%)	15,1	13,6
Arcilla (%)	4,1	2,2
<sup>2</sup> Fe <sub>o</sub> (g Kg <sup>-1</sup> )	0,13	0,01
<sup>3</sup> Al <sub>o</sub> (g Kg <sup>-1</sup> )	0,04	0,01
<sup>4</sup> Fe <sub>p</sub> (g Kg <sup>-1</sup> )	0,04	0,01
<sup>5</sup> Al <sub>p</sub> (g Kg <sup>-1</sup> )	0,04	0,01
<sup>6</sup> Fe <sub>d</sub> (g Kg <sup>-1</sup> )	0,39	0,05
<sup>7</sup> Al <sub>d</sub> (g Kg <sup>-1</sup> )	0,04	0,01

<sup>1</sup> CIC = Capacidad de intercambio catiónico.

<sup>2</sup> Fe<sub>o</sub> = Fe extraíble con oxalato amónico.

<sup>3</sup> Al<sub>o</sub> = Al extraíble con oxalato amónico.

<sup>4</sup> Fe<sub>p</sub> = Fe extraíble con pirofosfato de Na.

<sup>5</sup> Al<sub>p</sub> = Al extraíble con pirofosfato de Na .

<sup>6</sup> Fe<sub>d</sub> = Fe extraíble con ditionito-citrato.

<sup>7</sup> Al<sub>d</sub> = Al extraíble con ditionito-citrato.

### Estudio de degradación en “batch”

Los ensayos de deshalogenación con suelos en suspensión se realizaron por triplicado en frascos de vidrio de 50 ml tapados con “septum” de silicona y teflón (Supelco, Bellefonte, PA) y sellados con una capsula de aluminio.

En cada uno de los frascos se pesó 1 g de suelo contaminado al que se le añadió tampón tris-HCl, citrato de Ti (III) y agua hasta obtener una concentración final 200 mM de tris-HCl y 5 mM de citrato de Ti(III). A través de la suspensión se hizo pasar una corriente de N<sub>2</sub> durante 5 minutos, para purgar el aire del espacio de cabeza. Las muestras se dejaron en un agitador de vaivén y al cabo de 24 horas se retiró una muestra que se consideró el tiempo cero de la reacción (t=0). En el resto de las muestras se añadió 200 µL de citrato de Ti (III) 500 mM y 200 µL de hidroxocobalamina 73 µM, se purgó de nuevo con N<sub>2</sub> y se dejó en agitación continua. Se tomaron muestras a las 0,08 horas, 1h, 2h, 3h y 5h. Para asegurar el mantenimiento de las condiciones reductoras después de 5 horas se volvió añadir citrato de Ti y a purgar con N<sub>2</sub> y se tomaron muestras adicionales a las 10h y 24h. Además, se realizaron controles de 1 g de suelo con 25 ml de disolución con tampón tris-HCl (sin reductor ni vitamina B<sub>12a</sub>).

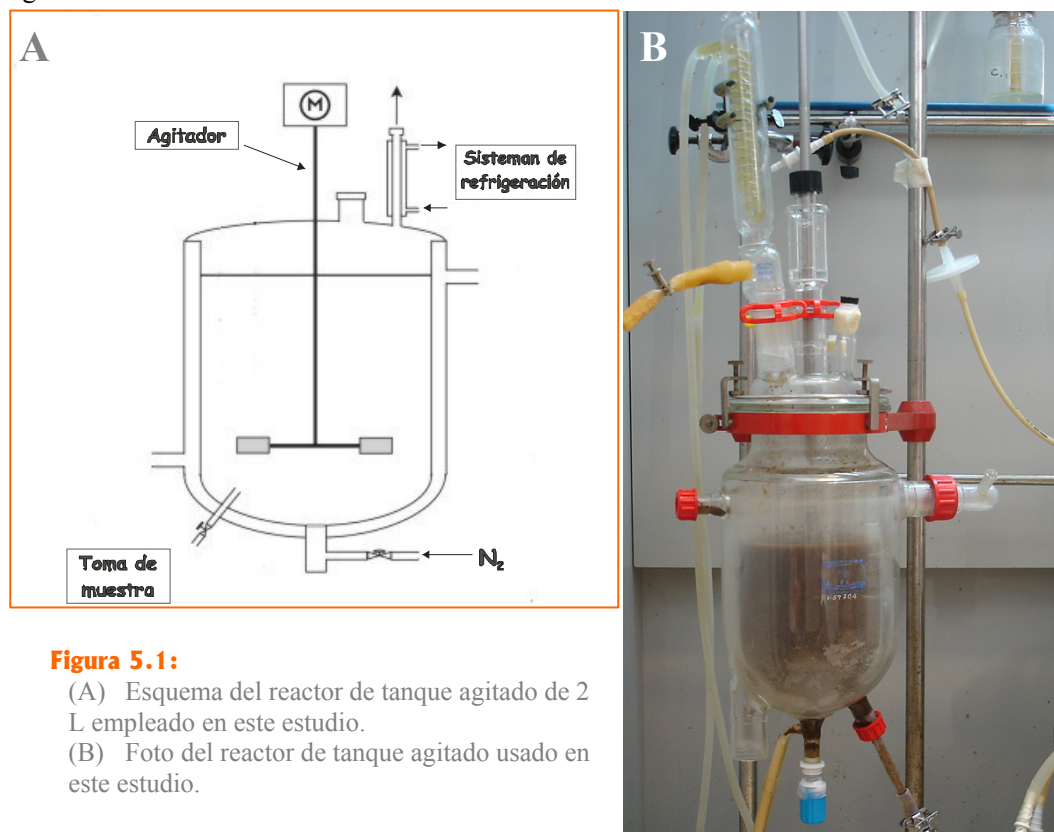
Las muestras retiradas se centrifugaron, separando la fase líquida y la fase sólida para el análisis posterior de los isómeros de HCH. En total se retiraron 54 suspensiones, correspondientes a las muestras recogidas a 8 tiempos diferentes más un control por suelo, de los dos suelos con los que se realizó el ensayo y repetido 3 veces  $((8 + 1) \times 2 \times 3)$ .

### Estudio de degradación en reactor

Una vez puesta a punto la metodología de degradación de los isómeros de HCH en suelos en suspensión a pequeña escala (sistema “batch”) se pasó el mismo proceso a un reactor de tanque agitado de 2 litros equipado con un impulsor tipo turbina (Figura 5.1). En una de las salidas superiores se colocó un condensador con un serpentín por el que circulaba agua a 5 °C con el fin de retener en el reactor posibles compuestos volátiles. De forma paralela al ensayo en “batch”, para cada suelo contaminado (suelo Ar y suelo MO) se hizo un



ensayo en reactor consistente en una suspensión de 5 % de suelo en medio reductor, obtenido por adición de citrato de titanio, y tamponado con disolución tris-HCl. Se agitó durante 24 horas y se tomó una alícuota que se consideró  $t=0$ . Posteriormente se añadió la vitamina B<sub>12a</sub>, se purgó y se mantuvo en agitación otras 24 horas, tomándose alícuotas a los distintos tiempos: 0,08h, 2h, 3h, 5h, 10h y 24h. Al igual que en el sistema “batch” se hizo una reinyección de citrato de Ti después de tomar las muestras de los tiempos 0h y 5h. Además, se hizo un control para cada suelo únicamente con disolución tris-HCl. Las alícuotas obtenidas a los distintos tiempos son una suspensión de suelo en una disolución acuosa, que posteriormente fueron centrifugadas para obtener por separado la fase acuosa y el suelo y analizar el contenido de HCH y sus compuestos de degradación en cada una de ellas.



Las condiciones de trabajo del reactor fueron las siguientes:

- Temperatura ambiente
- Agitación de 100 rpm.
- 5% de suelo: 90 gramos de suelo contaminado con 50 mg kg<sup>-1</sup> de cada uno de los isómeros de HCH y 1,8 L de disolución.
- Las concentraciones de tampón, citrato de Ti (III) y vitamina B<sub>12a</sub> fueron las mismas que en los ensayos en serie.
- Después de añadir todos los reactivos y tras cada toma de muestra se purgó durante 5 minutos con N<sub>2</sub>.

### Preparación de la muestra y métodos analíticos

#### *Extracción del HCH de la fase acuosa*

Una vez separada la fase líquida del resto de la suspensión se extrajeron 10 mL de muestra con 10 mL de hexano. La mezcla de extracción se dejó en un baño de ultrasonidos durante 60 minutos, después se secó la fase orgánica con sulfato sódico anhidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se reservó para el análisis cromatográfico.

#### *Extracción del HCH del suelo*

Tanto las muestras de suelo contaminado, con las que se realizaron los ensayos, como la fase sólida obtenida después de haber centrifugado las muestras de las suspensiones se extrajeron de la misma forma. Se mezcló la muestra con sulfato sódico anhidro pulverizado, se introdujo en una celda de aluminio de 11 mililitros y se procedió a su extracción con un equipo de líquidos a presión, un ASE<sup>®</sup> 200 (Accelerated Solvent Extractor). El método usado en la extracción con líquidos a presión fue el siguiente:

- ✓ Disolvente: hexano:acetona (1:1).
- ✓ P = 2000 psi.
- ✓ T = 100 °C.
- ✓ Tiempo de precalentamiento: 1 minuto.
- ✓ Tiempo estático: 5 minutos.
- ✓ Volumen de flujo: 60 %.
- ✓ Ciclos estáticos: 1.

Los extractos obtenidos se guardaron en nevera para su posterior análisis mediante cromatografía de gases.

### *Análisis cromatográfico*

Para realizar la identificación de los intermedios de reacción y para la identificación y cuantificación los isómeros de HCH se utilizó un cromatógrafo de gases (modelo 3400, Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) equipado un detector de espectrometría de masas de trampa iónica (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). Se trabajó con un inyector de split/splitless en modo splitless y el volumen de inyección fue 1  $\mu$ l. Para la separación se usó una columna capilar (CP-Sil 8 CB Low Bleed/MS) de 0,25 mm  $\times$  30 m y helio como gas portador (80 KPa). El programa de temperatura del horno del GC/MS fue: 35°C (6 min), aumento de 3°C min<sup>-1</sup> hasta los 100°C y posterior aumento de 8°C min<sup>-1</sup> hasta 270°C. Las temperaturas de la interfase y de la fuente de iones fueron de 280 y 220°C, respectivamente y la energía de ionización fue de 70 eV.

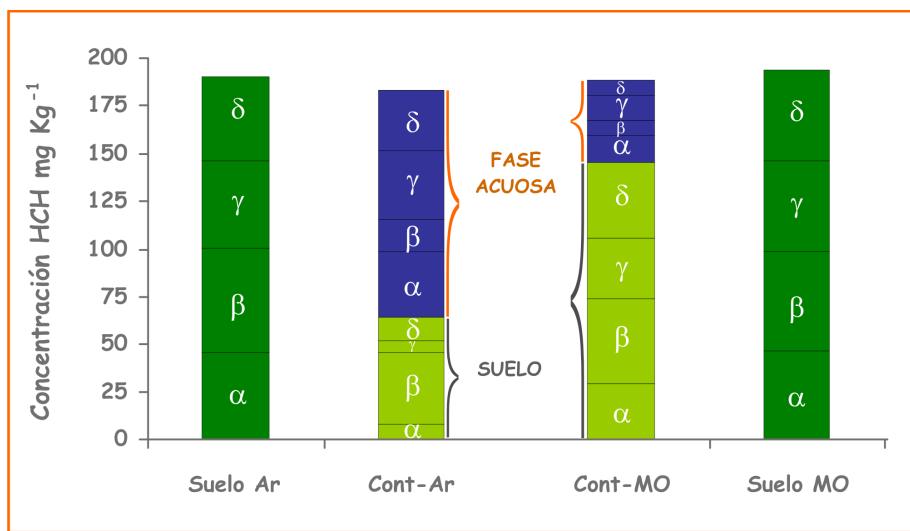
## Resultados y discusión

### Degradación de HCH en suelos: sistema “batch”

Los suelos utilizados para el ensayo de degradación estaban contaminados artificialmente con  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  de cada isómero de HCH ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ). En la Figura 5.2 se presenta la comparación de los isómeros en las muestras originales de suelo (suelo Ar y suelo MO) y su distribución entre las fases sólida y líquida de las suspensiones tras 24 horas de agitación acuosa tamponada con tris-HCl (Cont-Ar y Cont-MO). Estos controles no presentaban prácticamente variaciones en la cantidad de ninguno de los isómeros de HCH respecto al suelo original, lo que indica que no hubo degradación durante este periodo. Sin embargo, vemos una clara diferencia entre los dos controles en la distribución del HCH entre la fase líquida y la sólida. Así, en el Cont-Ar los isómeros de HCH pasan fácilmente a la fase acuosa de la suspensión, mientras que en el Cont-MO permanecen enlazados al suelo. En el Cont-Ar más del 80% de  $\alpha$ - y  $\gamma$ -HCH, el 73% de  $\delta$  y el 31% de  $\beta$ -HCH pasó a la disolución. Estos porcentajes se reducen considerablemente en el Cont-MO. En esta suspensión la mayor parte del HCH permaneció retenido en el suelo y sólo el 25% del contenido total pasó a la fase líquida de la suspensión.

**Figura 5.2:**

Concentración de los isómeros  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH en las muestras suelo Ar y suelo MO y distribución de isómeros entre fase acuosa y fase sólida de las suspensiones en los Cont-Ar y Cont-MO del ensayo en “batch”.



En las Figuras 5.3 y 5.4 se presentan los resultados del estudio cinético de degradación en serie para los suelos Ar y MO, respectivamente. En ambos casos se presentan los resultados acumulados obtenidos del análisis en la fase sólida y la fase líquida. El tiempo cero corresponde a la suspensión del suelo en la disolución acuosa con tris-HCl y en medio reductor después de 24 horas de equilibrio y antes de la adición de vitamina B<sub>12a</sub>. Los tiempos posteriores se contabilizaron a partir del momento de la adición de vitamina B<sub>12a</sub>.

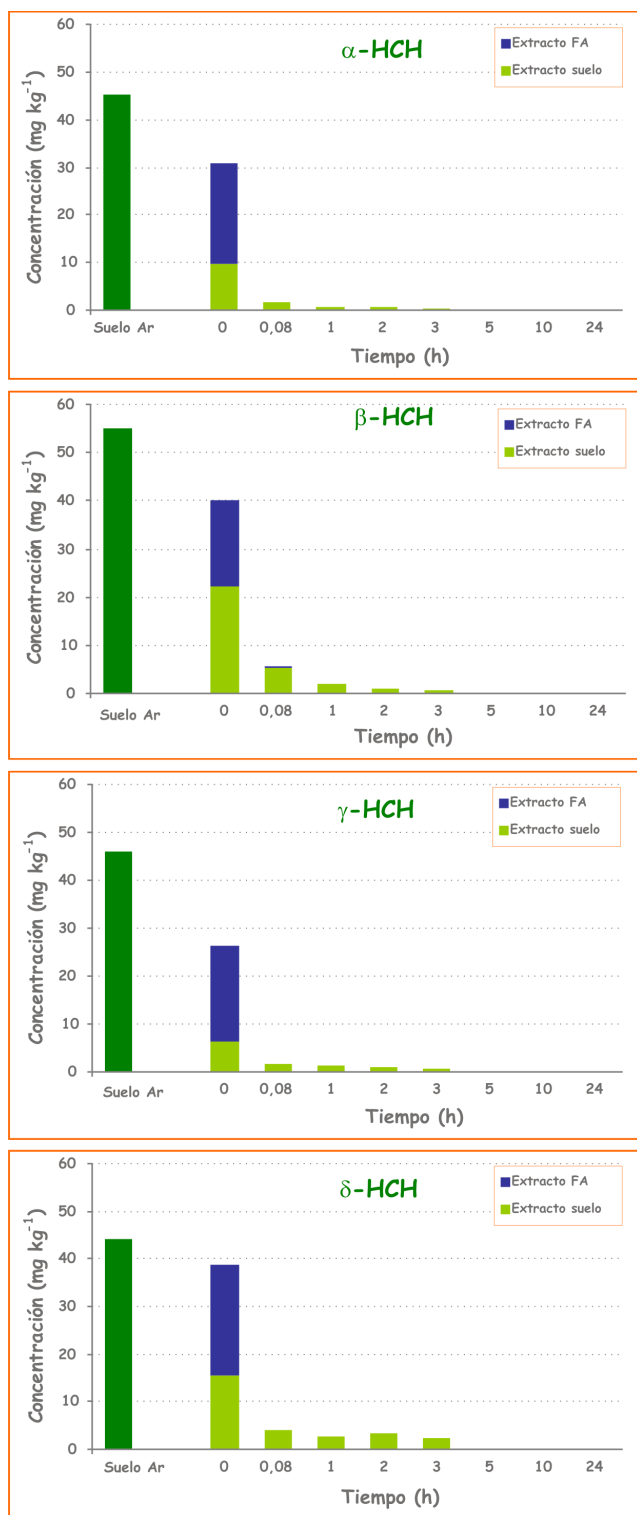
En el suelo Ar se observó una reducción de la concentración de los cuatro isómeros de HCH tras el periodo de equilibrio en medio reductor ( $t=0$ ). La degradación era proporcionalmente más importante para  $\gamma$ -HCH (43%) y para  $\alpha$ -HCH (32%) que para  $\beta$ -HCH (27%) y  $\delta$ -HCH (12%). Tras la adición de la vitamina B<sub>12a</sub> se observó una rapidísima desaparición de los cuatro isómeros, permaneciendo retenido en el suelo solo un 5% del HCH original después de 5 minutos. Al cabo de 5 horas de haber añadido la vitamina B<sub>12a</sub> a la mezcla reactiva no se detectó ninguno de los isómeros de HCH, ni en la fase acuosa de la mezcla ni en el suelo (Figura 5.3), por lo tanto se puede decir que la degradación de todos los isómeros de HCH fue total. La degradación fue tan rápida que no se detectó HCH en la fase acuosa en ninguno de los tiempos, lo que indica que la velocidad de degradación es mayor que la velocidad de restablecimiento del equilibrio entre la concentración en suelo y fase acuosa. Se detectaron ligeras diferencias entre los diferentes isómeros en la velocidad de degradación, siendo alfa y gamma los isómeros de degradación más rápida.

En el suelo MO también se produjo una degradación inicial antes de la adición de la vitamina B<sub>12a</sub>, pero en todos los casos inferior a la observada en el suelo Ar. En este punto sólo se degradó el 14% de  $\alpha$ -HCH, el 7% de  $\beta$ -HCH, el 25% de  $\gamma$ -HCH y el 14% de  $\delta$ -HCH. Sin duda, la materia orgánica de este suelo limita la degradación. A pesar de todo, tras la adición de la vitamina B<sub>12a</sub> se observó un aumento muy importante de la degradación de todos los isómeros. Después de 5 minutos de agitación permanecían en la suspensión sólo 13,8 mg kg<sup>-1</sup> de  $\alpha$ -HCH, 28,4 mg kg<sup>-1</sup> de  $\beta$ -HCH, 11,3 mg kg<sup>-1</sup> de  $\gamma$ -HCH y 27,3 mg kg<sup>-1</sup> de  $\delta$ -HCH, de los 50 mg kg<sup>-1</sup> originales de cada isómero. La distribución entre la fase sólida y líquida muestra que la mayor parte del residuo sin degradar permanecía retenido en el suelo. La concentración permaneció prácticamente

constante hasta las 5 horas, momento en el que se produjo una desaparición adicional. Después de 10 horas no se detectó ninguno de los isómeros de HCH en la fase acuosa de la mezcla, pero sí en la fase sólida (Figura 5.3). Esto indica que el residuo de HCH quedó ocluido en el suelo, y no pasa a la disolución, por lo que el proceso de degradación, que tiene lugar en el medio acuoso, detiene su avance. Al final de la reacción, la degradación obtenida fue del 93% para el isómero  $\alpha$ -HCH, del 88% para  $\beta$ -HCH, del 94% para  $\gamma$ -HCH y del 91% para el isómero delta.

El orden de degradación obtenido para los distintos isómeros de HCH ( $\gamma > \alpha > \delta > \beta$ ) coincide con el encontrado en el ensayo de degradación de HCH en agua (Rodríguez-Garrido et al., 2004) y también con el propuesto por diversos autores (Buser and Müller, 1995; Jagnow et al., 1977; Quintero Díaz, 2004) y coincide con el orden en el que aumenta el número de cloros en posición axial (más reactivos) en torno al ciclohexano.

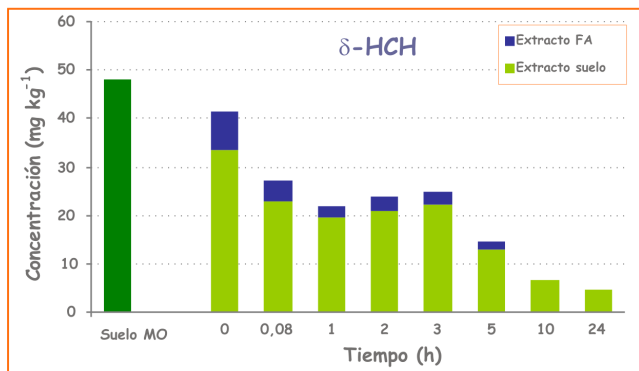
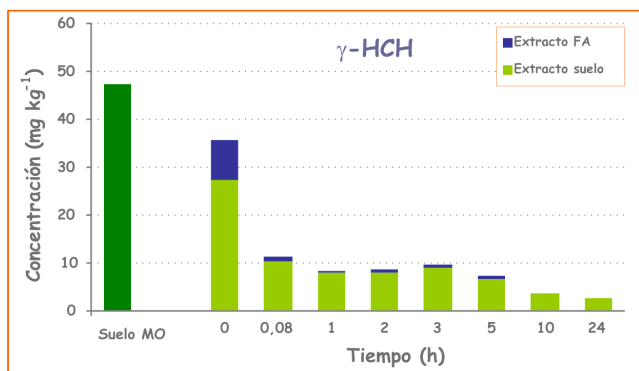
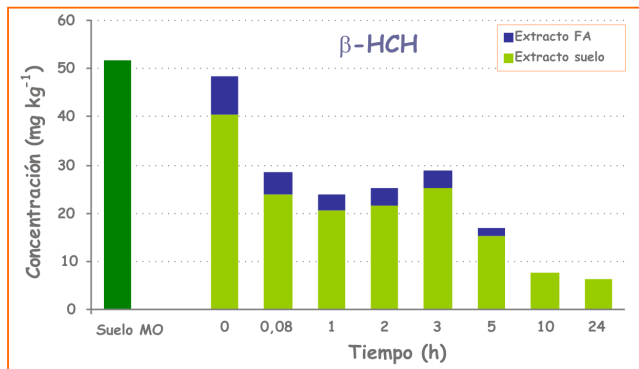
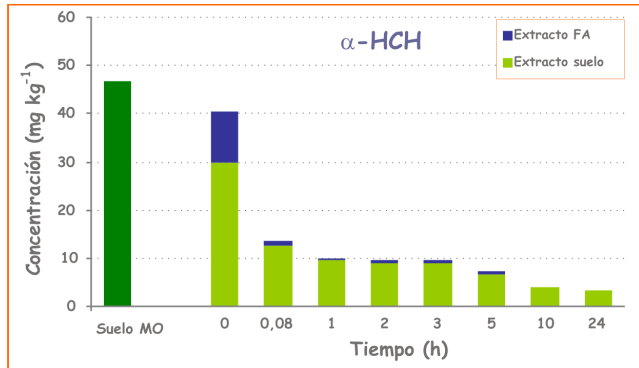
Comparando los resultados obtenidos en suelos en suspensión con los obtenidos en medio acuoso (Rodríguez-Garrido et al., 2004) se ve que las velocidades de reacción son más lentas, lo que se debe fundamentalmente a las limitaciones asociadas a la transferencia de materia entre el suelo y la fase líquida (Quintero Díaz, 2004; Rijnaarts et al., 1990). Este efecto es más marcado en el caso del suelo MO, puesto que la presencia de materia orgánica ejerce una mayor retención del HCH, mientras que en el suelo arenoso (suelo Ar) la capacidad de retención es mucho menor. Además, el efecto de la retención por la materia orgánica es mayor para los isómeros beta y delta, coincidiendo con su mayor afinidad por fases orgánicas. De acuerdo con estos resultados, Quintero Díaz (2004), en estudios de degradación con el hongo *B. adusta* en aguas, suelos y suspensiones encontró que la velocidad de degradación era mayor en aguas, seguido de suspensión y más lenta en suelos, demostrando que la transferencia de materia es un proceso clave en los procesos de degradación.



**Figura 5.3:** Concentración de los isómeros  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH en el suelo Ar, en el cont Ar y muestras Ar a los diferentes tiempos del ensayo en serie.

**Figura 5.4:**

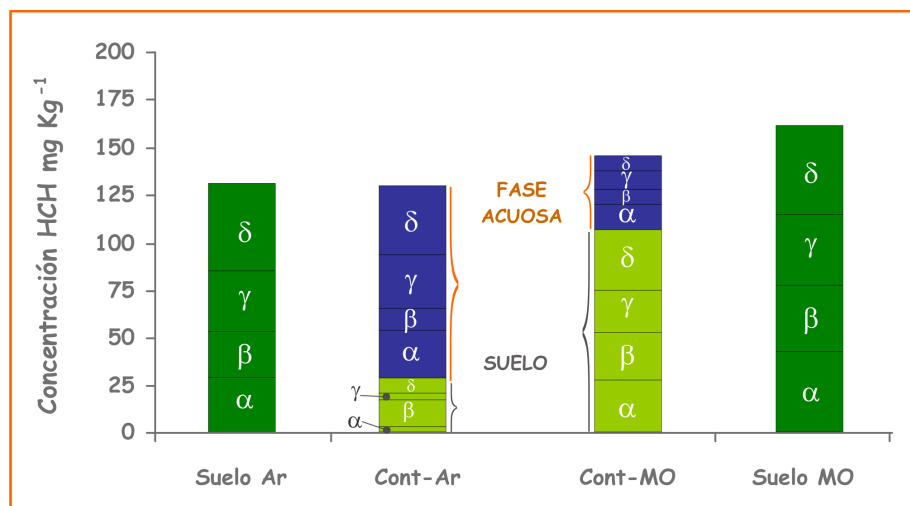
Concentración de los isómeros  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH en el suelo MO, en el cont MO y muestras MO del ensayo en serie a los diferentes tiempos del ensayo.





## Degradación de HCH en suelos: reactor

La concentración inicial de los suelos contaminados resultó ser inferior a la teórica: 30 mg kg<sup>-1</sup> de  $\alpha$ -HCH, 25 mg kg<sup>-1</sup> de  $\beta$ -HCH, 33 mg kg<sup>-1</sup> de  $\gamma$ -HCH y 47 mg kg<sup>-1</sup> de  $\delta$ -HCH en el caso del suelo Ar y de 44 mg kg<sup>-1</sup> para  $\alpha$ -HCH, 36 mg kg<sup>-1</sup> para  $\beta$ -HCH, 39 mg kg<sup>-1</sup> para  $\gamma$ -HCH y 48 mg kg<sup>-1</sup> para  $\delta$ -HCH en el caso del suelo MO. En la Figura 5.5 se presentan las concentraciones de los isómeros en cada uno de los suelos y la distribución entre las fases sólida y líquida después de agitación de las suspensiones (Cont-Ar y Cont-MO) en el reactor. La cantidad de HCH total presente en los controles es igual a la presente en el suelo original, lo que indica que, al igual que ocurría en el ensayo “batch”, no hubo degradación en las suspensiones, y por tanto, en estas condiciones, no hay ningún factor en el suelo capaz de llevar a cabo la degradación de ninguno de los isómeros de HCH. En el reactor, tal y como ocurría en los ensayos en serie, los isómeros pasan mucho más fácilmente a la disolución en el caso del Cont-Ar, mientras que en el Cont-MO existe una mayor retención en la fase sólida. El porcentaje de HCH que pasó a la disolución en el Cont-Ar (88% de  $\alpha$ -HCH, 46% de  $\beta$ -HCH, 87% de  $\gamma$ -HCH y 80% de  $\delta$ -HCH) fue superior al obtenido en los ensayos en serie, lo que indicaba que la agitación en el reactor favorecía el paso del HCH a la disolución. En el Cont-MO el porcentaje de HCH que pasó a la disolución fue similar al obtenido en el ensayo en serie, aunque se observó un aumento para el isómero  $\beta$ -HCH, el 14% de  $\beta$ -HCH estaba en disolución en los ensayos en serie, mientras que en el reactor alcanzaba el 21%.



**Figura 5.5:**

Concentración de los isómeros  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH en las muestras suelo Ar y suelo MO y distribución de isómeros entre fase acuosa y fase sólida en las suspensiones Cont-Ar y Cont-MO del ensayo en reactor.

En las Figuras 5.6 y 5.7 se presentan los resultados del estudio de degradación en reactor para los suelos AR y MO, respectivamente. En ambos casos se presentan los resultados acumulados obtenidos del análisis en la fase sólida y fase líquida de la suspensión. El tiempo cero corresponde a la suspensión del suelo en la disolución acuosa con tris-HCl y medio reductor después de 24 horas de agitación y antes de la adición de la vitamina B<sub>12a</sub>. Los tiempos posteriores se tomaron a partir de la adición de la hidroxocobalamina.

Al igual que ocurría en los ensayos en serie, en el suelo Ar se observó una disminución de la concentración de todos los isómeros de HCH tras el periodo de equilibrio y antes de añadir la vitamina. Esta degradación fue muy elevada para el isómero gamma, alcanzando el 91 % y mucho menor para el resto de los isómeros (20 % de  $\alpha$ -HCH, 10 % de  $\beta$ -HCH y 3,5 % de  $\delta$ -HCH).

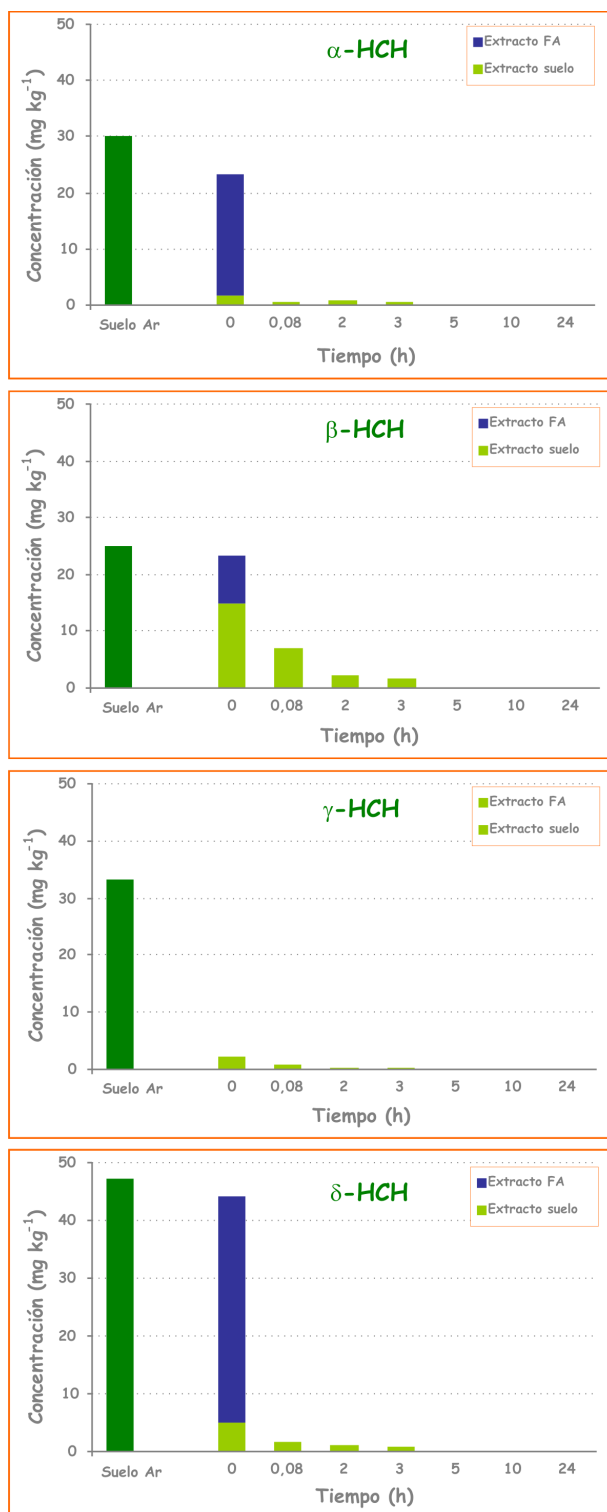
Tras la adición de la vitamina B<sub>12a</sub> la desaparición de los cuatro isómeros en el suelo Ar fue rapidísima, siendo superior al 94 %, al cabo de 5 minutos, para  $\alpha$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH y del 75 % para el  $\beta$ -HCH. Al cabo de 5 horas de haber añadido la vitamina B<sub>12a</sub> no se detectaba ninguno de los isómeros de HCH, ni en la fase acuosa ni en la fase sólida de la suspensión (Figura 5.6). Al igual que ocurría en los ensayos en serie, por tanto, la degradación de todos los isómeros de HCH fue total, manteniéndose los resultados con el cambio de escala (de “batch” a reactor). De nuevo, se observa una degradación más rápida para los isómeros alfa y gamma y ligeramente más rápida en el reactor, probablemente debido a las óptimas condiciones de agitación que facilitan la transferencia de materia del suelo a la fase líquida

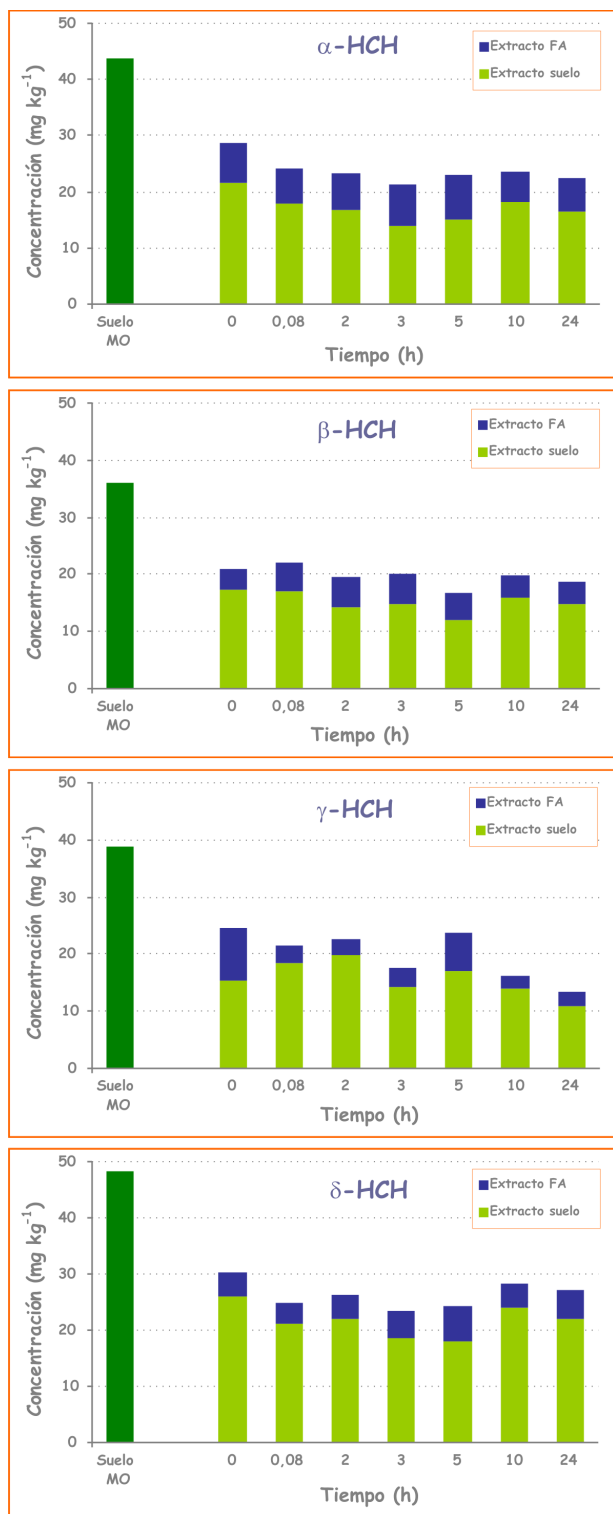
En el suelo MO (Figura 5.7) también se produjo una degradación inicial de todos los isómeros de HCH antes de la adición de la vitamina B<sub>12a</sub>. En estas condiciones la degradación del isómero  $\gamma$ -HCH (36 %) era menor que con el suelo Ar, sin embargo, se alcanzó una mayor degradación para  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\delta$ -HCH (34, 42 y 37 %, respectivamente). Además, este orden de reactividad ( $\beta > \delta > \gamma > \alpha$ ) no coincidía con el esperado ( $\gamma > \alpha > \delta > \beta$ ), que es el orden encontrado en los ensayos en disolución acuosa (Capítulo 4), en los ensayos en serie, en el ensayo en reactor con el suelo Ar y en otros estudios publicados (Buser and Müller, 1995; Jagnow et al., 1977; Quintero Díaz, 2004).

Después de añadir la vitamina B<sub>12a</sub> la degradación de los isómeros de HCH sólo aumentó ligeramente; al cabo de las 24 horas había desaparecido el 49% de  $\alpha$ -HCH, el 48% de  $\beta$ -HCH, el 65% de  $\gamma$ -HCH y el 44% de  $\delta$ -HCH. En este caso la presencia de materia orgánica en el suelo no es la única responsable de la desaceleración de la reacción, puesto que, aunque una gran parte del HCH está retenida en el suelo, también se detectaba en la fase acuosa, donde permanecían 0,29 mg l<sup>-1</sup> de  $\alpha$ -HCH, 0,20 mg l<sup>-1</sup> de  $\beta$ -HCH, 0,12 mg l<sup>-1</sup> de  $\gamma$ -HCH y 0,26 mg l<sup>-1</sup> de  $\delta$ -HCH. Todo parece indicar que en estas condiciones la reacción en el reactor se bloqueaba y la adición de vitamina no catalizaba la deshidrohalogenación de los isómeros de HCH, reacción que sí avanzaba en las mismas condiciones pero a pequeña escala. Esto podría deberse a que el aumento de reactividad conseguido en el reactor, debido a la agitación, también podría estar favoreciendo otras reacciones del suelo que dificulten el mantenimiento de las condiciones de pH y potencial redox necesarias para que la vitamina actúe, es decir, condiciones en torno a la neutralidad y Eh suficientemente bajo para conseguir la reducción del Co (III) a Co (I). En el suelo MO el elevado contenido de aluminio de cambio podría consumir una parte importante de la capacidad tampón de la disolución, aportada por el tris, mientras que los oxi-hidróxidos de hierro podrían consumir parte del potencial reductor aportado por el citrato de Ti (III). En este caso, a diferencia de lo que ocurría con el suelo Ar, los resultados no se mantenían con el cambio de escala. En los estudios de degradación de HCH realizados por Quintero Díaz (2004) con el hongo *B. adusta* en suspensiones de suelo obtuvieron un incremento significativo de la degradación al pasar de matraces a un reactor, lo que atribuyeron a la mejor homogenización del sistema y mayor transferencia de oxígeno en este último sistema.

**Figura 5.6:**

Concentración de los isómeros  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH en el suelo Ar y en las muestras de suspensión de este suelo tomadas a los distintos tiempos en el ensayo en el reactor. (Extracto FA y extracto suelo corresponden a las fases líquida y sólida de la suspensión, respectivamente).





**Figura 5.7:**

Concentración de los isómeros  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH en el suelo MO y en las muestras de suspensión de este suelo tomadas a los distintos tiempos durante el ensayo de degradación en el reactor. (Extracto FA y extracto suelo corresponden a las fases líquida y sólida de la suspensión, respectivamente).

## Productos formados en la degradación de HCH

### *Productos de degradación detectados en los ensayos en "batch"*

En los cromatogramas correspondientes a las muestras de degradación en el suelo Ar se detectaron diferentes productos de degradación del HCH sólo en los tiempos iniciales: pentaclorociclohexeno (**PCCH**), tetraclorociclohexeno (**TCCH**) y clorobenceno (**CB**). La identificación de los picos cromatográficos correspondientes a estos compuestos se hizo por comparación de sus espectros de masas (Figura 4. 10 en Capítulo 4) con los de la biblioteca de espectros (NIST 02). De los 8 isómeros existentes de PCCH y los 7 de TCCH (Buser and Müller, 1995) se detectaron 3 de PCCH y 1 de TCCH. La distinción entre los isómeros no puede realizarse por el espectro de masas, puesto que son muy similares y se realizó por sus tiempos de retención. No obstante, las cantidades detectadas de todos los productos de degradación fueron muy pequeñas, por debajo del límite de cuantificación para el CB.

En los cromatogramas correspondientes a las muestras de degradación en el suelo MO también se detectaron PCCH, TCCH y CB, aunque en este caso se detectaron 3 de isómeros de PCCH y otros 3 de TCCH. La concentración de estos productos era mayor que en el suelo Ar y se detectaron durante todo el ensayo de degradación, hasta  $t=24h$ .

### *Productos de degradación detectados en los ensayos en reactor*

Los productos de degradación detectados en los ensayos en el reactor con el suelo Ar fueron 2 isómeros de PCCH, 1 isómero de TCCH y CB, todos ellos detectados entre  $t=0$  y  $t=5h$ . Las cantidades fueron muy pequeñas y en menor número de muestras que en el ensayo en serie. Probablemente la elevada velocidad de la reacción es la responsable de escasa acumulación de compuestos intermedios.

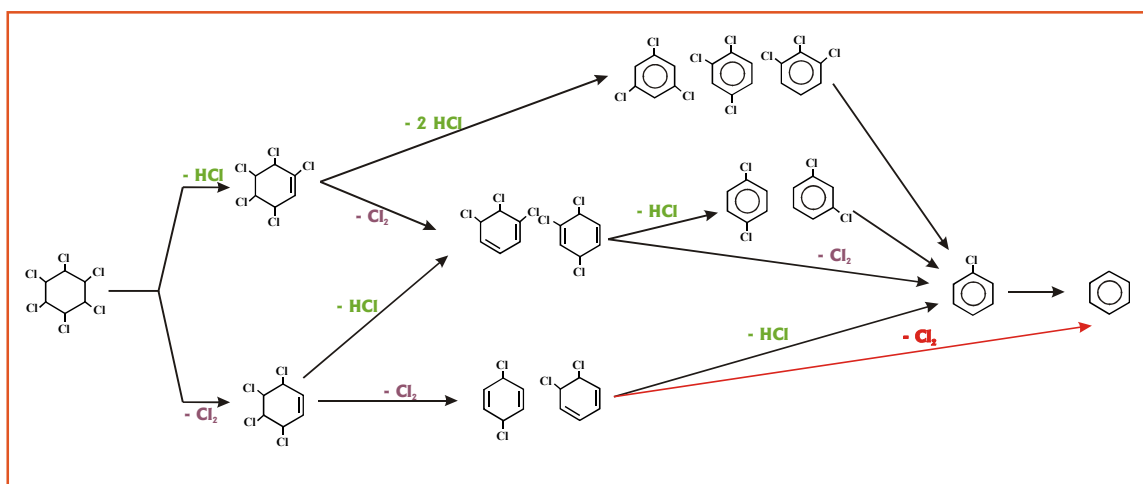
Los cromatogramas obtenidos de las muestras de la degradación en reactor del suelo MO muestran la presencia de 3 isómeros de PCCH, 3 isómeros de TCCH y CB, igual que en los ensayos en serie, si bien una comparación de las cantidades detectadas sería más difícil, porque no todos los compuestos aparecen en todas las muestras y porque las áreas de los picos son relativamente pequeñas y muy similares. El CB sólo se detectó en la fase líquida de las

suspensiones, mientras que PCCH y TCCH se detectaron tanto en la fase líquida como en el suelo, lo que podría indicar una mayor afinidad de la materia orgánica por estos dos últimos.

No se observó acumulación de ninguno de los compuestos de degradación de HCH a lo largo del tiempo, ni siquiera de CB, compuesto que se propone como producto final en muchas rutas degradativas (Bachmann et al., 1988; Marks et al., 1989). De hecho, en el presente trabajo se observó una disminución de CB con el tiempo, lo que parece indicar que es un intermedio.

A partir de estos resultados se propone una ruta degradativa esquematizada en la Figura 5.8. La degradación podría comenzar con una **deshalogenación vecinal** (eliminación dos átomos de Cl de dos C vecinales entre los que se forma un doble enlace C=C y se elimina Cl<sub>2</sub>) para formar TCCH (Bachmann et al., 1988; Jagnow et al., 1977; Marks et al., 1989) o **deshidrohalogenación antiperiplanar** (eliminación de 1 Cl y 1 H de C vecinales en la que se forma un doble enlace C=C y se elimina HCl) para formar PCCH, aunque este compuesto se ha detectado generalmente cuando la reacción comienza con un paso oxidativo (Bachmann et al., 1988; Sahu et al., 1995). El isómero beta no puede reaccionar por deshidrohalogenación antiperiplanar para formar PCCH puesto que para que se dé esta reacción debe haber un H y un Cl en posición antiparalela y el isómero beta no lo tiene (Buser and Müller, 1995). La formación de PCCH también puede atribuirse a reacciones de hidrólisis, cuya velocidad se ha demostrado que aumenta en condiciones alcalinas (Liu et al., 2003). Las reacciones siguientes serían también deshidrohalogenación o deshalogenación, pudiendo formarse triclorobencenos (TCB), diclorobencenos (DCB) o clorobenceno (CB) (Liu et al., 2003). Debido a que no se acumula CB, lo más probable es que la reacción continúe para formar benceno. Diversos autores señalaron que la formación de benceno sólo ocurría con mediación enzimática en medio biótico (Middeldorp et al., 1996; Phillips et al., 2005), sin embargo, Liu et al. (2003) propusieron su formación en presencia de FeS sólido en medio abiótico (aunque no lo detectaron). En el presente trabajo no se ha podido confirmar ni descartar la presencia de benceno puesto que la elución de este compuesto es muy rápida en las condiciones cromatográficas utilizadas y si

estuviera presente probablemente eluiría durante el tiempo de demora del disolvente (tiempo de “delay”).



**Figura 5.8:**

Ruta degradativa propuesta en este estudio para el HCH basándonos en los intermediarios de degradación identificados y en datos bibliográficos (Bachmann et al., 1988; Buser and Müller, 1995; Middeldorp et al., 1996; Liu et al., 2003).



### Conclusiones

1. Para los ensayos realizados en serie la degradación al cabo de 24 horas fue total en el caso del suelo arenoso, mientras que para el suelo rico en materia orgánica la degradación fue del 94% para  $\gamma$ , 93% para  $\alpha$ , 91% para  $\delta$  y 88% para  $\beta$ -HCH, quedando retenido en el suelo el HCH no degradado. Probablemente la materia orgánica es la responsable de que la degradación no sea completa, ya que retiene al HCH y no lo deja pasar a la disolución, donde se produce la reacción de deshalogenación.
2. En los ensayos realizados en reactor la degradación a las 24 horas fue también completa en el caso del suelo arenoso, siendo incluso más rápida que en el ensayo batch. En el suelo rico en materia orgánica la degradación fue menor que en el caso de los ensayos en serie (65% de degradación de  $\gamma$ -HCH, 49% de  $\alpha$ -HCH, 48% de  $\beta$ -HCH y del 44% para  $\delta$ -HCH) y, además, la reacción se bloqueó, quedando HCH en disolución sin ser degradado.
3. La velocidad de degradación de los isómeros de HCH en el suelo aumentó en el orden:  $\beta < \delta < \alpha < \gamma$ , lo que coincide con el número creciente de Cl en posición axial ( $\beta=0$ ,  $\delta=1$ ,  $\alpha=2$ ,  $\gamma=3$ ).
4. La presencia de PCCH, TCCH y CB, junto con la disminución de HCH confirman que se produjo la degradación, aunque serían necesarios más estudios para confirmar los mecanismos de reacción y los compuestos finales de la degradación, entre los que podría estar el benceno.
5. Los resultados indican que el método propuesto de degradación reductiva de HCH catalizada por la vitamina B<sub>12a</sub>, en presencia de citrato de Ti (III), aplicado a suelos en suspensión, es una técnica viable para la descontaminación “*ex situ*” de suelos arenosos, escasamente tamponados y con baja capacidad de retención del contaminante. Sin

embargo, aunque el método es potencialmente viable para matrices edáficas más complejas, como suelos ricos en materia orgánica, con elevada acidez potencial y/o con contenidos elevados de óxidos de hierro fácilmente reducibles, son necesarios ensayos adicionales para conseguir el mantenimiento de las condiciones reductoras durante la degradación.

### Referencias

- Adhya, T.K., S.K. Apte, K. Raghu, N. Sethunathan and N.B.K. Murthy. 1996. Novel polypeptides induced by the insecticide lindane ( $\gamma$ -hexachlorocyclohexane) are required for its biodegradation by a *Sphingomonas paucimobilis* Strain. Biochem. Biophys. Res. Comm. 221:755-761.
- Assaf-Anid, N., K.F. Hayes and T.M. Vogel. 1994. Reduction dechlorination of carbon tetrachloride by cobalamin(II) in the presence of dithiothreitol: Mechanistic study, effect of redox potential and pH. Environ. Sci. Technol. 28:246-252.
- Assaf-Anid, N., L. Nies and T.M. Vogel. 1992. Reduction dechlorination of a polychlorinated biphenyl congener and hexachlorobenzene by vitamin B12. Appl. Environ. Microbiol. 58:1057-1060.
- Bachmann, A., P. Walet, P. Wijnen, W. De Bruin, J.L.M. Huntjens, W. Roelofsen and A.J.B. Zehnder. 1988. Biodegradation of alpha- and beta-hexachlorocyclohexane in a soil slurry under different redox conditions. Appl. Environ. Microbiol. 54:143-149.
- Bhuyan, S., S.K. Sahu, T.K. Adhya and N. Sethunathan. 1992. Accelerated aerobic degradation of  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane in suspensions of flooded and non-flooded soils pretreated with hexachlorocyclohexane. Biol. Fertility Soils. 12:279-284.
- Breivik, K., J.M. Pacyna and J. Münch. 1999. Use of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane in europe, 1970–1996. Sci. Total Environ. 239:151-163.
- Buser, H. and M.D. Müller. 1995. Isomer and enantioselective degradation of hexachlorocyclohexane isomers in sewage sludge under anaerobic conditions. Environ. Sci. Technol. 29:664-672.

- Chiu, P. and M. Reinhard. 1995. Metallocoenzyme-mediated reductive transformation of carbon tetrachloride in titanium(III) citrate aqueous solution. *Environ. Sci. Technol.* 29:595-603.
- Datta, J., A.K. Maiti, D.P. Modak, P.K. Chakrabartty, P. Bhattacharyya and P.K. Ray. 2000. Metabolism of  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane by arthrobacter citreus strain BI-100: Identification of metabolites. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 46:59-67.
- Doelman, P., L. Haanstra, E. de Ruiter and J. Slange. 1985. Rate of microbial degradation of high concentrations of  $\alpha$ -hexachlorocyclohexane in soil under aerobic and anaerobic conditions. *Chemosphere.* 14:565-570.
- Harms, H. and T.N.P. Bosma. 1997. Mass transfer limitation of microbial growth and pollutant degradation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 18:97-105.
- IUPAC. 1976. Nomenclature of corrinoids (rules approved 1975). *Pure Appl. Chem.* 48:495-502.
- Jagnow, G., K. Haider and P.C. Ellwardt. 1977. Anaerobic dechlorination and degradation of hexachlorocyclohexane isomers by anaerobic and facultative anaerobic bacteria. *Arch. Microbiol.* 115:285-292.
- Johri, A.K., M. Dua, D. Tuteja, R. Saxena, D.M. Saxena and R. Lal. 1998. Degradation of alpha, beta, gamma and delta-hexachlorocyclohexanes by sphingomonas paucimobilis. *Biotechnol. Lett.* 20:885-887.
- Jones, K.C. and P. de Voogt. 1999. Persistent organic pollutants (POPs): State of the science. *Environ. Pollut.* 100:209-221.
- Langenhoff, A.A.M., J.J.M. Staps, C. Pijls, A. Alphenaar, G. Zwiep and H.H.M. Rijnaarts. 2002. Intrinsic and stimulated in situ biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH). *Water Air Soil Pollut.* 2:171-181.
- Lewis, T.A., M.J. Morra and P.D. Brown. 1996. Comparative product analysis of carbon tetrachloride dehalogenation catalyzed by cobalt corrins in the

- presence of thiol or titanium(III) reducing agents. *Environ. Sci. Technol.* 30:292-300.
- Liu, X., P. Peng, J. Fu and W. Huang. 2003. Effects of FeS on the transformation kinetics of  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane. *Environ. Sci. Technol.* 37:1822-1828.
- MacRae, I.C., K. Raghu and T.F. Castro. 1967. Persistence and biodegradation of four common isomers of benzene hexachloride in submerged soils. *J. Agric. Food Chem.* 15:911-914.
- Marks, T.S., J.D. Allpress and A. Maule. 1989. Dehalogenation of lindane by a variety of porphyrins and corrins. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1258-1261.
- Middeldorp, P.J.M., M. Jaspers, A.J.B. Zehnder and G. Schraa. 1996. Biotransformation of a-, b-, g-, and d-hexachlorocyclohexane under methanogenic conditions. *Environ. Sci. Technol.* 30:2345-2349.
- Mougin, C., C. Pericaud, C. Malosse, C. Laugero and M. Asther. 1996. Biotransformation of the insecticide lindane by the white rot basidiomycete *phanerochaete chrysosporium*. *Pestic. Sci.* 47:51-59.
- Ogwada, R.A. and D.L. Sparks. 1986. Kinetics of ion exchange on clay minerals and soil: I. Evaluation of methods. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 50:1158-1162.
- Phillips, T.M., A.G. Seech, H. Lee and J.T. Trevors. 2005. Biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) by microorganisms. *Biodegradation.* 16:363-392.
- Pignatello, J.J. and B. Xing. 1996. Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. *Environ. Sci. Technol.* 30:1-11.
- Quintero Díaz, J.C. 2004. Biorrecuperación de suelos contaminados con hexaclorociclohexano. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. Departamento de Ingeniería Química .

- Quintero, J.C., M.T. Moreira, J.M. Lema and G. Feijoo. 2006. An anaerobic bioreactor allows the efficient degradation of HCH isomers in soil slurry. *Chemosphere* 63:1005-1013.
- Rijnaarts, H.H.M., A. Bachmann, J.C. Jumelet and A.J.B. Zehnder. 1990. Effect of desorption and intraparticle mass transfer on the aerobic biomineralization of alpha -hexachlorocyclohexane in a contaminated calcareous soil. *Environ. Sci. Technol.* 24:1349-1354.
- Rodriguez-Garrido, B., M.C. Arbestain, M.C. Monterroso and F. Macias. 2004. Reductive dechlorination of alpha -, beta -, delta -, and gamma - hexachlorocyclohexane isomers by hydroxocobalamin in the presence of either dithiothreitol or titanium(III) citrate as reducing agents. *Environ. Sci. Technol.* 38:5046-5052.
- Sahu, S.K., K.K. Patnaik, S. Bhuyan, B. Sreedharan, N. Kurihara, T.K. Adhya and N. Sethunathan. 1995. Mineralization of alpha-, gamma-, and beta-isomers of hexachlorocyclohexane by a soil bacterium under aerobic conditions. *J. Agric. Food Chem.* 43:833-837.
- Simoni, S.F., A. Schafer, H. Harms and A.J.B. Zehnder. 2001. Factors affecting mass transfer limited biodegradation in saturated porous media. *J. Contam. Hydrol.* 50:99-120.
- Sims, J.L., J.M. Suflita and H.H. Russell. 1991. Reductive dehalogenation of organic contaminants in soils and groundwater. In Robert S. Kerr (ed.) *EPA Ground Water Issue*. Environmental Research Laboratory, Ada, Oklahoma.
- Van Eekert, M.H.A., N.J.P. Van Ras, G.H. Mentink, H.H.M. Rijnaarts, A.J.M. Stams, J.A. Field and G. Schraa. 1998. Anaerobic transformation of b-hexachlorocyclohexane by methanogenic granular sludge and soil microflora. *Environ. Sci. Technol.* 32:3299-3304.

Walker, K., D.A. Vallero and R.G. Lewis. 1999. Factors influencing the distribution of lindane and other hexachlorocyclohexanes in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 33:4373-4378.

# **Conclusiones generales**





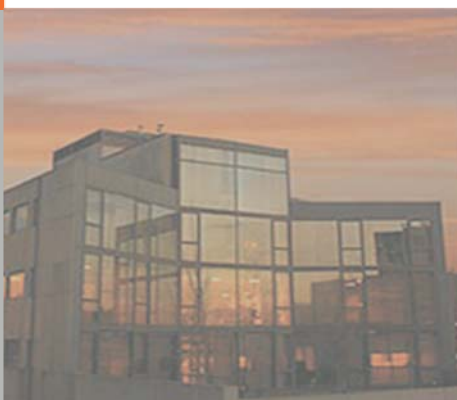
1. Los estudios llevados a cabo en los terrenos contaminados con HCH en el polígono de Torneiros mostraron que la composición del residuo bruto presente en estos suelos procedía de la fabricación de lindano, puesto que el principal componente del residuo fue el isómero  $\alpha$ -HCH, con un porcentaje del 78% del HCH total, seguido de isómero  $\beta$ -HCH (16%), y con un bajo contenido de  $\gamma$ - (4%) y  $\delta$ -HCH (2%). El estudio de lixiviación de este residuo demostró las diferentes solubilidades de los isómeros, resultando el isómero delta, minoritario en el residuo, el mayoritario en los lixiviados. Además, estos lixiviados mostraron efectos ecotóxicos. La distribución del HCH en el área contaminada era muy heterogénea, tanto en superficie como en profundidad. La extracción con agua utilizando la técnica de extracción con líquidos presurizados (ASE) es comparable a la conseguida con el uso de la resina XAD-2 y podría ser un buen estimador de la fracción potencialmente biodisponible de HCH en el suelo.
  
2. Los estudios de retención de HCH en diferentes suelos y coloides del suelo mostraron que los cuatro isómeros presentaban comportamientos similares para un mismo sorbente, pero había grandes diferencias entre los distintos sorbentes. La capacidad de retención decreció en el siguiente orden: ácido húmico >> caolinita  $\approx$  montmorillonita > A-A > A-P > B-F > A-A sin MO > goetita > A-P sin MO > arena. Las isotermas obtenidas fueron de tipo L para los sorbentes con elevada capacidad de retención de HCH (ácido húmico, A-A, A-P, montmorillonita y caolinita) y de tipo S para los de escasa retención (A-A sin MO, A-P sin MO, B-F, goetita, y arena), en los que los procesos de competencia con el solvente por los sitios de sorción cobraban mayor importancia. La materia orgánica del suelo es el componente que mayor cantidad de HCH retiene, siendo su cantidad un factor decisivo para el aumento de retención pero también su naturaleza. En ausencia de materia orgánica, las arcillas del suelo pueden tener un papel relevante en la retención de HCH en el suelo, mientras que los óxidos de hierro

tendrían una limitada importancia. A pesar de las diferencias de superficie específica entre los minerales de la arcilla tipo 1:1 (caolinita) y tipo 2:1 (montmorillonita), no se encontraron diferencias en la capacidad de retención de HCH, lo que refleja que el contaminante no se adsorbe en el espacio interlaminar de la montmorillonita.

3. Los estudios de desorción con exudados, llevados a cabo en suelos contaminados con HCH, mostraron que los exudados de la raíz de *Holcus lanatus* ejercen un efecto positivo sobre la movilidad del HCH. Este efecto es comparativamente más importante para el isómero  $\beta$ -HCH, seguido de  $\alpha$ - y  $\gamma$ -HCH, que tienen el mismo comportamiento, y prácticamente inapreciable para el  $\delta$ -HCH. Este efecto puede variar con la composición del exudado y la concentración de los ácidos orgánicos de bajo peso molecular (AOBPM), principales componentes. En general, un aumento de la concentración produce un aumento de la movilidad del HCH y este efecto es mayor con compuestos fenólicos que con ácidos alifáticos. El ácido cumárico en concentración 10 mM, es el que aumenta más la solubilidad para  $\alpha$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH y la catequina la de  $\beta$ -HCH. El carbono orgánico parece ejercer un importante efecto en la movilidad de los isómeros de HCH, aumentando la movilidad con el aumento de carbono orgánico en disolución, perteneciente a los AOBPM. No se puede dar una explicación completa del papel de los exudados de la raíz sobre la movilización de los isómeros de HCH pero su influencia es evidente. Ya que la composición de los exudados varía entre especies vegetales y condiciones edáficas de crecimiento, sería necesario realizar estudios de detalle que permitan seleccionar las combinaciones óptimas de especie-manejo del suelo para maximizar el aumento de la biodisponibilidad del HCH, lo que favorecería la velocidad de su mineralización. Finalmente, los resultados de este estudio permiten plantear la posibilidad de utilizar compuestos de los exudados vegetales como enmienda del suelo para potenciar los procesos de fitocorrección de contaminantes hidrofóbicos.

4. Los estudios de degradación reductiva de HCH en medio acuoso en presencia de vitamina B<sub>12a</sub> como catalizador, mostraron que la degradación es mayor en presencia de citrato de Ti(III) como reductor (el cobalto de la vitamina se reduce de estado de oxidación +3 a estado de oxidación +1) que en presencia de ditiotreitól (el cobalto se reduce a estado de oxidación +2). La vitamina B<sub>12r</sub> (con cobalto en estado de oxidación +2) favorece la desaparición de  $\gamma$ - y  $\alpha$ -HCH pero no la de  $\beta$ - y  $\delta$ -HCH, mientras que la vitamina B<sub>12s</sub> (con cobalto en estado de oxidación +1) produce la degradación de  $\gamma$ - y  $\alpha$ -HCH hasta niveles indetectables en 1 y 2 minutos respectivamente, y también se produce la degradación de  $\beta$ - y  $\delta$ -HCH (99,6% en 60 minutos y 99,9% en 10 minutos respectivamente).
5. El método propuesto de degradación reductiva de HCH catalizada por la vitamina B<sub>12a</sub>, en presencia de citrato de Ti (III), aplicado a suelos en suspensión, es una técnica viable para la descontaminación “*ex situ*” de suelos arenosos, escasamente tamponados y con baja capacidad de retención del contaminante. Sin embargo, aunque el método es potencialmente viable para matrices edáficas más complejas, como suelos ricos en materia orgánica, con elevada acidez potencial y/o con elevados contenidos de óxidos de hierro fácilmente reducibles, son necesarios ensayos adicionales para conseguir el mantenimiento de las condiciones reductoras durante la degradación.





## CONTENIDO

Capítulo 1: Estudio de la contaminación en el polígono de Torneiros (O Porriño)

Capítulo 2: Retención de los isómeros  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH en suelos y distintos componentes del suelo

Capítulo 3: Efecto de exudados radiculares sobre la movilidad de los isómeros de hexaclorociclohexano

Capítulo 4: Deshalogenación reductiva de  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH en medio acuoso

Capítulo 5: Deshalogenación reductiva de  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -HCH en suelos en suspensión